

博士（保健学）学位論文

RT-PCR法による食中毒事例からのノロウイルス検出と
遺伝子解析による感染経路の解明

Detection of *Norovirus* by RT-PCR from Food-borne Disease
and Determination of Transmission Route by Genetic Analysis

2 0 1 1 年

指導教員 桑原 祥浩 教授

林 志直

HAYASHI, Yukinao

女子栄養大学

目次

緒論	1
第 1 章 RT-PCR法によるノロウイルス検査法の開発	
緒言	5
材料と方法	5
結果	10
考察	13
結論	15
第 2 章 ウイルス性胃腸炎集団発生事例から検出されたノロウイルスの遺伝子型	
緒言	16
材料と方法	16
結果	19
考察	20
結論	21
第 3 章 ノロウイルス食中毒事例における遺伝子解析による原因追究	
緒言	25
材料と方法	25
結果	28
考察	31
結論	33
第 4 章 吐物によると思われたノロウイルス集団発生例の感染源の検討	
緒言	34

材料と方法	-----	3 4
結果	-----	3 8
考察	-----	4 0
結論	-----	4 1

第 5 章 無症状ノロウイルス感染調理従事者のノロウイルス排泄期間と排泄量

緒言	-----	4 2
材料と方法	-----	4 2
結果	-----	4 3
考察	-----	4 9
結論	-----	5 1

総括	-----	5 2
文献	-----	5 3
謝辞	-----	5 9

緒 論

ヒトに胃腸炎を起こすウイルスとしてノロウイルス¹⁾(*Norovirus*, 以下 NoV と略), サポウイルス²⁾(*Sapovirus*, 以下 SaV と略), ロタウイルス³⁾(*Rotavirus*, 以下 RV と略), アストロウイルス⁴⁾(*Astrovirus*, 以下 AstV と略), アデノウイルス⁵⁾(*Adenovirus*, 以下 AdV と略)が知られている(写真 1, 表 1)。

← 写真 1, 表 1

これらの胃腸炎起因ウイルスは 1970 年代に発見されて以来 40 年を経過し, RV と AstV および AdV は組織培養細胞を用いたウイルス増殖が可能となり, これを抗原として迅速診断キットも開発されている。しかし, NoV と SaV は感染動物実験系や組織培養法が確立されていないため, ウイルス性状の研究および検査の実施に未だ多くの課題が残されている。また, NoV 以外の胃腸炎起因ウイルスの好発年齢層は乳幼児等の低年齢層であり, 感染性胃腸炎の主要病原体であるが, NoV は乳幼児から高齢者まで幅広い年齢層に感染し, 食品を介して感染拡大する食中毒の病因

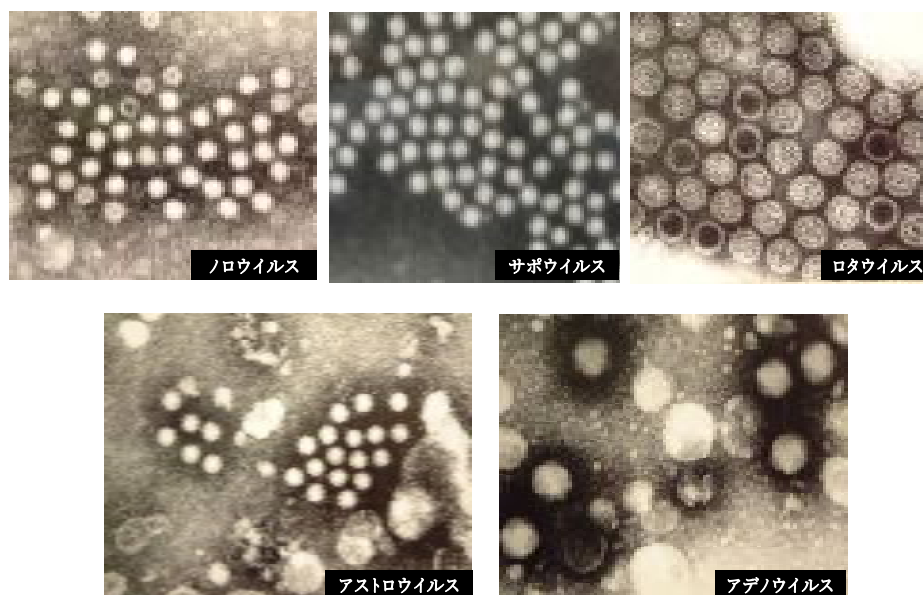


写真1. 胃腸炎起因ウイルスの電子顕微鏡像

表1. ヒトに胃腸炎を起こす主なウイルス

ウイルス	最初の報告年	好発年齢	核酸*	遺伝子群 血清型	培養法
ノロ	1972	全年齢	ss(+)RNA	G I・II・IV	—
カリシ	—	—	—	—	—
サポ	1976	乳幼児	ss(+)RNA	G I・II ・IV・V	—
ロタ	1973	乳幼児	dsRNA	A・B・C群	+
アストロ	1975	乳幼児	ss(+)RNA	1～8型	+
アデノ	1975	乳幼児	dsDNA	40・41型	+

*: ss 一本鎖、 ds 二本鎖

物質として最も重要なウイルスである。

NoV の最初の報告例は、米国オハイオ州の小学校における非細菌性胃腸炎集団事例からの検出例であり、集団事例の発生地名から Norwalk virus¹⁾と命名された。その後、世界各地から Norwalk virus と形態が類似したウイルスが電子顕微鏡により検出され、ノーウォーク様ウイルスあるいは小型球形ウイルス⁶⁾(Small round structured virus, 以下 SRSV と略)と呼ばれた。しかし、電子顕微鏡を用いたウイルス検索は、形態観察によりウイルス種を同定するため検査に熟練を要するものであった。その後、1970～80年代には酵素抗体法⁷⁾、ウエスタンブロット法⁸⁾など様々な NoV 検査法が開発されたが、いずれの方法もヒト由来の抗原および抗体を用いた検査法のため、試薬の特異性は不安定で、使用できる試薬量も有限であった。1990年に Norwalk virus のクローニングが行われ全塩基配列が明らかにされる⁹⁾と、逆転写 PCR 法(Reverse transcription-polymerase chain reaction, 以下 RT-PCR 法と略)が開発され検査に用いられる

表2.国際ウイルス命名委員会(ICTV)の
カリシウイルス分類

科(Family)	属(Genus)	種(Species)
<i>Caliciviridae</i>	<i>Norovirus</i>	<i>Norwalk virus</i>
	<i>Sapovirus</i>	<i>Sapporo virus</i>
	<i>Lagovirus</i>	<i>Rabbit hemorrhagic disease virus</i> <i>European brown hare syndrome virus</i>
	<i>Vesivirus</i>	<i>Feline calicivirus</i> <i>Vesicular exanthema of swine virus</i>
	<i>Nebovirus</i>	<i>Newbury-1 virus</i>

ようになった。我が国でも冬季に多発する非細菌性食中毒から SRSV が高率に検出されるようになったことから、1997 年に旧厚生省は食中毒病因物質に SRSV を加えた¹⁰⁾。2002 年に国際ウイルス命名委員会は、SRSV を含んだカリシウイルス科を形態学的特徴、遺伝子配置を含んだ塩基配列情報、宿主域、病原性等に基づいて 5 属に分類した（表 2）。← 表 2

SRSV と呼ばれていたウイルスは、カリシウイルス科(*Caliciviridae*)–ノロウイルス属(*Norovirus*)–ノーウォークウイルス種(*Norwalk virus*)に属することになった。このカリシウイルス科の分類変更に伴い厚生労働省は、2003 年に食中毒病因物質名を SRSV から NoV に変更した¹¹⁾。NoV の遺伝子群は I (Genogroup I, 以下 GI と略)から IV(GI～GIV)までに群別され、ヒトから検出される NoV は GII が圧倒的に多い。また、それぞれの遺伝子群はさらに遺伝子型に細分化され、30 以上の遺伝子型が知られている¹²⁾。

Norwalk virus のクローニングから得られた塩基配列情報に基づいた初

期の RT-PCR 法は、NoV 遺伝子の多様性から検出率が低かった。Norwalk virus と同一遺伝子群の NoV は検出するが、異なった遺伝子群には対応できていなかった。また近年、NoV 食中毒の発生状況が変化している。2000 年前後まで NoV 食中毒の推定原因食品は、カキ・シジミ・ハマグリ・アサリ等の二枚貝を主体としていたが、最近では NoV を排泄する調理従事者によって汚染された食品を原因とすることが多い。

このような遺伝子多型を示す NoV について、著者は独自に様々な遺伝子型を幅広く検出できる RT-PCR 法を開発し、その方法を用いてウイルス検索を進め、NoV 食中毒の原因解明と遺伝子解析による感染経路を明らかにしようとした。

第1章 RT-PCR 法によるノロウイルス検査法の開発

I-1 緒言

NoV は冬季に多発するウイルス性食中毒，乳幼児や小児の急性胃腸炎の原因ウイルスである。1990 年にノーウォークウイルスの全遺伝子配列が明らかとなり⁹⁾，これを契機として RT-PCR 法が行われるようになった。しかし当初に開発された RT-PCR 法では，予想に反してノーウォークウイルスと同じ遺伝子群のウイルスは検出可能であったが，異なった遺伝子群のウイルスは全く検出されず，低い NoV 陽性率にとどまった¹³⁾。その原因として NoV 遺伝子の多様性があげられる。そこで，様々な遺伝子型の NoV を幅広く認識するプライマーを設定することにより RT-PCR 法の検出率を高め，ウイルス性胃腸炎集団発生のウイルス検索に応用可能な検査法の開発を試みた。

I-2 材料と方法

I-2-1 糞便材料

今回開発した RT-PCR 法の NoV 検出性能評価は，1994 年 10 月から 1995 年 2 月の間に発生した NoV 性胃腸炎集団発生 5 事例 80 名の患者糞便を使用した。

検査は，「食品衛生法」（58 条 2 項），「食品衛生施行令」（36 条），「感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律」（感染症法 15 条）に基づいて行うものであり，東京都健康安全研究センター倫理審査委員会の承認を取り，倫理面への配慮を行った。

I -2-2 検査材料の前処理

患者と調理従事者の糞便は、超遠心により粗精製と濃縮を次のように行った¹⁴⁾。糞便約 1g に 2 価の陽イオンを含まないリン酸緩衝等張液 (phosphate buffered saline, 以下 PBS(-)と略: pH7. 2: 日水製薬)を加えて 10%乳剤を調整し、低速遠心(3,000rpm 15 分: Hitachi CF15), 冷却高速遠心(8,000rpm 30 分: Himac 20)を順次行った後の上清を冷却超遠心(27,000rpm 180 分: Himac 80β)し、得られた沈殿を 400μl の Tris-NaCl 緩衝液(0.01M Tris-HCl, 0.15 M NaCl, pH7.2)に再浮遊し、核酸抽出材料とした。

I -2-3 核酸抽出

核酸の抽出は CTAB 法¹⁵⁾により行った。核酸抽出材料 100μl に 10%SDS(ナカライテスク)10μl, 20mg/ml proteinase K (和光純薬) 2.5μl 加えて混和し、37℃15 分間水浴で加熱した。10%セチル-トリメチル-アンモニウム-ブロマイド (和光純薬) 25μl と 4M NaCl 25μl を加えて混和し、56℃15 分間水浴で加熱した。フェノール・クロロホルム・イソアミルアルコール(25:24:1, 和光純薬)を 150μl 加えて核酸抽出し、14,000rpm15 分間の冷却遠心分離によって水層を回収した。これをエタノール沈殿し、得られた沈渣を蒸留水 50μl により溶解して核酸材料とした。

I -2-4 RT-PCR 法

RT-PCR 法に用いたプライマーと、新たに設定したプライマーを用いた RT-PCR 産物の電気泳動像を表 1 に示した。



これらのプライマーはいずれも遺伝子相同性の高い RNA 依存性 RNA ポリメラーゼ領域に設定されたプライマーである。逆転写反応, 1st PCR の後に検出感度を向上させるために再度 2nd PCR を行った。逆転写反応にはプライマー NV35A, NC35C¹⁵⁾, MR4¹⁶⁾を用い、核酸抽出液 12 μl と

表1. プライマーの塩基配列

プライマー	sense	5' - 配列	文献
1st PCR			
NV 35	—	CTT GTT GGT TTG AGG CCA TA	Moe,J.C.M.1994
MR 4	—	AGT GGG TTT GAG GCC GTA TT	Lew,J.Virol.1994
NV 36	+	ATA AAA GTT GGC ATG AAC A	Moe,J.C.M.1994
MR 3	+	CCG TCA GAG TGG GTA TGA A	Lew,J.Virol.1994
2nd PCR			
NV 51	—	GTT GAC ATC TCA ACA TCA TC	Moe,J.C.M.1994
NV 3	+	GCA CCA TCT GAG ATG GAT GT	Moe,J.C.M.1994
NV81	—	ACA ATC TCA TCA TCA CCA TA	新規設定
NV82	+	TCA TTT TGA TGC AGA TTA	新規設定
SM82	+	CCA CTA TGA TGC AGA TTA	新規設定



表 1. に添付した写真は、新規設定したプライマーによる 2nd PCR 産物の電気泳動像。

レーン 1,2,5,7,9,12,14 に 330bp の Nov 陽性バンドが確認される。レーン M:100bp マーカー

5×First Strand Buffer (invitrogen) 6 µl, 2.5mM dNTPs (TaKaRa) 1.5 µl, 50mM 逆転写プライマー 0.75 µl, 100mM Dithiothreitol (invitrogen) 1.5 µl, 40U/µL Rnase inhibitor (ナカライタスク) 1 µl, 逆転写酵素 Super Script II (invitrogen) 1.5 µl, および蒸留水 5.75 µl を用いて, 42°C, 60 分間の逆転写反応を行い, 反応後は氷冷した。

1st PCR は, 逆転写反応チューブに 1st PCR 試薬を加える one tube 反応で行った。プライマー NV36¹⁵⁾, MR3¹⁶⁾を使用し, 10×Ex Taq Buffer (TAKARA) 5µl, 2.5mM dNTPs (TAKARA) 4µl, 50mM 1stPCR プライマー 0.5 µl, Ex Taq ポリメラーゼ (TAKARA) 0.25µl, および蒸留水 39.75µl を加え, 94°C5 分を 1 回, 94°C1 分・55°C1 分・72°C1 分を 40 回, 72°C15 分の反応を行った。

2nd PCR には 1st PCR 産物 1 μ l を使用し, NV51¹⁵⁾, NV3¹⁵⁾の他, 新たに著者らが設定した NV81, NV82, SM82 を用いた。RT-PCR 法は Jiang らの方法¹⁷⁾により行った。

PCR 産物は 2%アガロースゲル (TAKARA) で電気泳動後にエチジウムブロマイド染色し, UV 照射により 470bp, 330bp, 206bp の増幅バンドを確認し, さらに得られた PCR 産物はハイブリダイゼーションによる確認試験を行った。

I -2-5 ドットブロットハイブリダイゼーション法

I -2-5-1 プローブの調製

クローン化した NoVGI と GII の PCR 標的領域から ECL ランダムラベリングキット (Amersham Life Science) により FITC 標識を行い, プローブを作製した。操作の術式は添付書類の方法に従った。

I -2-5-2 ハイブリダイゼーション

プローブの検出は ECL 検出キット (Amersham Life Science) のマニュアルに従って行った。すなわち, 1st PCR および 2nd PCR 産物 4 μ l とハイブリダイゼーション陽性対照 0. 5 μ l をナイロンメンブランにスポット後, 紫外線クロスリンカー (TAITEC) により UV 固定し, 50°C で乾燥した。メンブランを 5xSSC (SIGMA) で湿らせた後にハイブリバッグに挟み込み, 予め 50°C に暖めておいたハイブリダイゼーション緩衝液 0. 125ml/cm² を加えてハイブリバッグをヒートシールした。プレハイブリダイゼーションを 50°C 30 分行った後にプローブを加え, 50°C で一夜ハイブリダイゼーションを行い, メンブランをハイブリダイゼーション洗浄液に浸した後, 新たなハイブリバッグに移した。洗浄液を 0. 25ml/cm² 加え, 50°C 15 分間洗浄を行った。次にメンブランを ECL 緩衝液 (Amersham Life

Science)に浸し、ブロッキング液中で室温 30 分間振とうした。ECL 緩衝液に抗 FITC-HRP 標識抗体(1000 倍希釈), 0. 5%BSA(和光純薬)を加えた抗体試薬とメンブランを室温 30 分間反応させた後に, 抗体洗浄液で 10 分間の洗浄を 3 回行った。メンブランを新たなハイブリバッグに挟み, 化学発光基質液 1 と同液 2 (Amersham Life Science)を 0. 06ml/cm² ずつを加えて 37℃2 分間反応させた後, 新たなハイブリバッグに封入してオートラジオグラフ用フィルム(Amersham Life Science)に 30 分間感光させた。フィルムを現像し, シグナルが検出された場合を NoV 陽性と判定した。

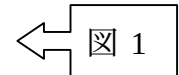
I -2-6 検出された NoV の遺伝子解析

上記 I -2-4RT-PCR 法で NoV 陽性と判定した材料について遺伝子解析を行った。塩基長 206bp の PCR 産物を遺伝子解析する際にはプライマー NV51, NV3 を, 塩基長 330bp の PCR 産物を遺伝子解析するにはプライマー NV81, NV82, SM82 を使用した。PCR 産物を Montage-PCR(Millipore)を用いて精製し, Big Dye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit(Applied Biosystems)によるシーケンス反応を行った。反応産物を Centri Sep Spin Columns (Applied Biosystems)を用いて精製し, ABI PRISMTM Genetic Analyzer 310 (Applied Biosystems)により塩基配列を決定した。得られた塩基配列は遺伝子解析ソフトウェア Genetyx (ゼネティクス)によりアライメントを作成し, UPGMA(Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic mean)法¹⁸⁾による遺伝子系統樹解析から遺伝子型を判定した。

I - 3 結果

I -3-1 新たなプライマーNV81, NV82, SM82 の設定

Moe ら ¹⁵⁾のプライマーNV35, NV36 と NV51, NV3 は NoVGII にはほとんど無効であった ¹³⁾ことから GeneBank の遺伝子情報に基づき遺伝子群 GI, GII とともに検出しうる新たなプライマーの設定を試みた。NV35 と NV36 に挟まれた 430bp の領域において NoV10 株の塩基配列情報を比較し、ノーウォークウイルスの塩基配列と異なった株数を示した(図 1)。用いた塩基配列情報は GI がノーウォークウイルス：GeneBank アクセス No. M87611, KY89 株：L23828, Sa1283 株：L23832, SOV 株：L07418, DSV 株：GII は SMA 株：L23831, HWV 株：U07611, TV 株：U02030, OTH 株：L23830, 925UK 株：L23826 であった。



その結果、ノーウォークウイルスの塩基番号 4543-4560 領域はノーウォークウイルスと SMA 株の混合、4853-4872 領域はノーウォークウイルスの塩基配列を用いれば NoVGI, GII とともに検出できることが予測された。このプライマーセットを用いた場合に得られる PCR 産物の長さは 330bp であった(表 1)。

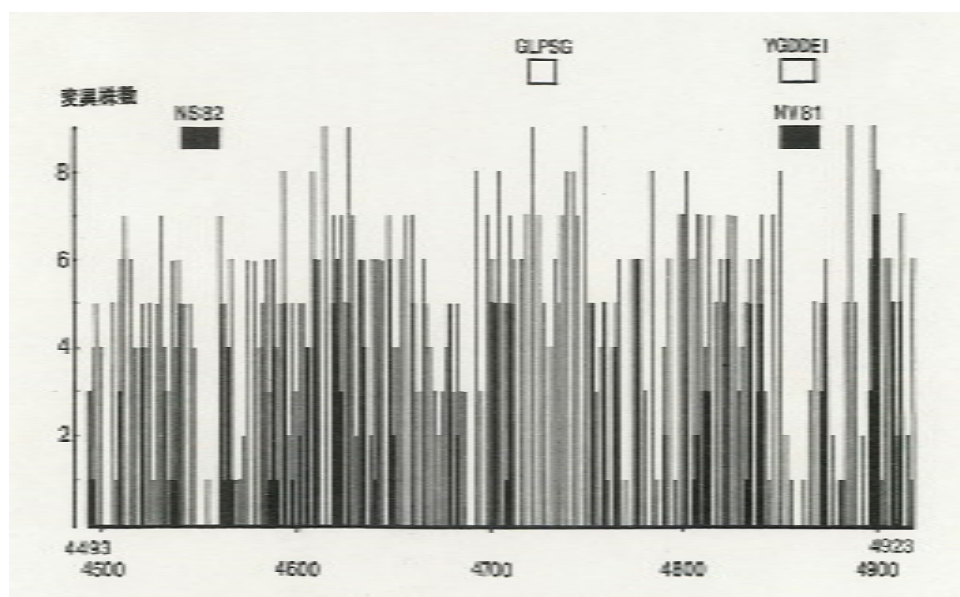


図1. NV35からNV36領域において遺伝子変異の認められた株数 (n = 10)

NV35,NV36 間の領域 (Norwalk virus の塩基番号 4493 から 4923) について, Norwalk virus の塩基配列とその他の株 (9株) の塩基配列を比較し, 塩基が異なった株数を棒グラフで示した。棒グラフの谷間 (変異が少ない) 部分にプライマー 81と82を設定し, ■で示した。RNA ポリメラーゼのアミノ酸基本モチーフ2ヶ所 (GLPSG, YGDDEI) を□で示した。

表2. プライマーNV51/3 (従来法) とNV81/82・SM82(開発法)の比較

事件	検体数	従来法		開発法		PCR 判定
		1st PCR NV35/36	2nd PCR NV51/3	2nd PCR NV81/82		
A	17	2	2	12		13
B	10	0	3	3		3
C	12	1	5	6		6
D	13	0	8	8		8
E	28	10	12	16		17
合計	80	13	30	45		47

I -3-2 既知のプライマーと新規設定プライマーの有効性の比較

検体数が 10 件以上の集団事例 5 件についてプライマーNV35, NV36 を用いて 1st PCR を行い, 2nd PCR を新規設定したプライマー NV81/NV82, SM82 および従来から使用している NV51/NV3 を用いて, NoV の検出状況を比較し, 結果を表 2 に示した。1st PCR での陽性数はわずか 13 件であったが, 新規プライマーを用いた 2nd PCR により陽性数は 45 件(陽性率 56.3%)にまで増加し, 従来の 2nd PCR プライマー NV51/NV3 の成績と比較して陽性数は 1.5 倍に増加した。

一方, 事件 A と E のように新規プライマーを用いても検出できない検査材料の存在も認められた。

← 表 2

表3. NV51/3 (従来法) とNV81/82・SM82(開発法)により
検出されたノロウイルスの遺伝子型と株数

遺伝子型	GI			GII					合計
	1	2	3	1	2	3	4	6	
従来法 NV51/3	4	3	3						10
開発法 NV81/82	4	2	3	2	2	6	6	1	26

I -3-3 従来法と開発法により検出された NoV の遺伝子型の比較

塩基配列を決定し、遺伝子解析を実施できたのは、表 2 で従来法により NoV 陽性となった 30 株中 10 株、開発法により NoV 陽性となった 45 株中 26 株であった(表 3)。

遺伝子解析の結果、従来法によって検出された NoV は GI/1, GI/2, GI/3 の 3 種類で、それぞれの遺伝子型に 4 株, 3 株, 3 株が分類された。開発法では GI/1, GI/2, GI/3 と GII/1, GII/2, GII/3, GII/4, GII/6, 合計 8 種類の遺伝子型に分類された。解析を行った範囲では、最も多かったのが GII/3 と GII/4 でありそれぞれ 6 株, 次いで GI/1 が 4 株確認された。

I - 4 考察

NoV の検査法は、これまで大きく分けて 3 段階の進歩を遂げてきた。最初の段階は疫学調査が中心の 1970 年代までであり, 米国等におけるいくつかのボランティア実験により感染性因子の存在が確認されていたに

過ぎなかった。第 2 段階は、1972 年にノーウォークウイルスが発見されたことを契機とし、NoV の検出と分類が試みられた。第 3 段階は NoV 感染症の診断に遺伝子検査法が導入された時点から現在に至るまでである。

著者らは、Moe らのプライマー¹⁵⁾を用いて NoV 検索に RT-PCR 法を導入したが必ずしも良好な成績が得られず、NoV の遺伝子多型の問題から広範囲に NoV を検出するプライマーの必要性を指摘してきた¹³⁾。今回新たなプライマーを設定する際に、NoV の遺伝子群 GI, GII ともに効率よく検出できるよう配慮した。逆転写と 1st PCR では、これまで GI の塩基配列に基づいた NV35/NV36 のみであったが、更に GII に由来する MR3/MR4 を加えた。また、2nd PCR においてもプライマー82 領域は GI 由来の NV82 と GII の SM82 を併用した。その結果、従来用いていたプライマーと比較すると NoV 検出率が 1.5 倍上昇し、顕著な陽性率の向上をもたらした。また、塩基配列が決定可能な NoV について遺伝子解析を実施すると、従来法のプライマーにより検出できた NoV は全て GI であり、開発法によって検出された NoV では GI, GII ともに確認することができた。これは開発法のプライマーが、当初の目的であった GI, GII 群ともに検出できたことにより、NoV 陽性率の向上をもたらしたと考えられた。しかし、表 2 の事例 A と E のように、新規設定したプライマーのみでは検出できない症例もみられたことから、NoV の検出にあたっては複数のプライマーを併用すべきと考えられた。

1997 年に食品衛生法の改正により NoV が食中毒病因物質に加えられたこともあって検査件数が増加傾向にあり、その後現在に至るまで増加しつつある。また、検査材料の 10%以上を食品が占めているが、カキ以外の食品からの NoV 検出率は非常に低い。この原因としてカキ以外の食

品に含まれる NoV 濃度が現在実施している RT-PCR 法の検出限界以下であることが考えられる。今後の検討課題として、食品等ウイルス量が微量である検査材料からの検出率を向上させる手法の開発が必要である。

I - 5 結論

本章で著者らが新規設定したプライマー NV81, NV82, SM82 を用いることにより、非細菌性胃腸炎集団発生事例から NoV を高率に検出することができた。現在 NV81, NV82, SM82 は旧厚生省の通達により食品衛生法に基づき NoV 検査の標準プライマーとして記載され、高い評価を得られるようになっている。一方、今後さらに検査需要の増加が予測される食中毒推定原因食品などで、ウイルス汚染量の少ない材料から NoV が検出できるような検査法の開発を進める必要がある。

第2章 ウイルス性胃腸炎集団発生事例から検出された ノロウイルスの遺伝子型

Ⅱ－１ 緒言

東京都内では毎年約 100 事例の食中毒が発生している¹⁹⁾。NoV 性食中毒はカキ等の二枚貝を原因食品とする事例が過半数を占めていたが、2003 年以降その割合は 20%程度まで減少し、これに代わって調理従事者によってウイルス汚染された食品に起因する事例が増加している。

本章では、2006 年 1 月から 2009 年 12 月までの間に発生した胃腸炎集団発生事例に関してウイルス検索を行い、検出された NoV の遺伝子解析を行った。なお、厚労省は 2003 年に NoV 検査法の見直しを行い、それまでの RT-PCR 法に替えてリアルタイム PCR 法を標準検査法とした。このことから NoV の検出は 2006 年以降はリアルタイム PCR 法を採用した。

Ⅱ－２ 材料と方法

Ⅱ-2-1 供試材料

2006 年 1 月から 2009 年 12 月までに、東京都内で発生した胃腸炎集団発生 2,670 事例から得られた患者、非発症者、調理従事者のふん便と食品材料 24,79 件を検査材料とした。

検査は、「食品衛生法」(58 条 2 項)、「食品衛生施行令」(36 条)、「感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律」(感染症法 15 条)に基づいて行うものであり、東京都健康安全研究センター倫理審査委員会の承認を取り、倫理面への配慮を行った。

Ⅱ-2-2 リアルタイムPCR法によるNoVの検索

2006年から2009年までは、厚生労働省通知法¹¹⁾に示されたリアルタイ

△PCR法によるNoV検索を実施した。

Ⅱ-2-2-1 検査材料の前処理

検査材料（糞便）は 2 価の陽イオンを含まないリン酸緩衝等張液（phosphate buffered saline : PBS(-), pH7.2 : 日水製薬）により 10%乳剤を調製し, 3,000 rpm, 10 分遠心分離 (HITACHI himac CF8DL) を行った。その上清を分取し, 核酸抽出材料とした。

Ⅱ-2-2-2 核酸抽出

核酸の抽出は, 核酸抽出材料140μlから厚生労働省通知法¹¹⁾に示された QIAamp Viral RNA Miniキット (QIAGEN)を用いて行った。キットの添付書に従って操作を行い, 核酸抽出液60μlを得た。

Ⅱ-2-2-3 cDNA合成

逆転写反応は, 5×First Strand Buffer(Invitrogen) 6μl, 2.5mM dNTPs (TaKaRa) 1.5μl, 1μg/μlRandom hexamer (Amersham Biosciences) 0.75μl, 100mM Dithiothreitol(Invitrogen) 1.5μl, 40U/μlRNase inhibitor(ナカライテスク) 1μl, 200U/μl Super Script II RNaseH⁻逆転写酵素(Invitrogen) 1.5μl, および蒸留水5.75μlと核酸抽出液12μlを混合し, 42°C 60分の条件でcDNAを作製した。

Ⅱ-2-2-4 リアルタイムPCR法

NoV 遺伝子の検出は, 厚生労働省通知法¹¹⁾に基づいたリアルタイムPCR法により実施した。すなわち, cDNA5μlと 2× Realtime PCR Mastermix (Applied Biosystems) 12.5μl, プライマー各 0.2μl, プローブ 0.3μl, および蒸留水 6.8μl を用いて, ABI PRISM 7900TM (Applied Biosystems) により行った。プライマーおよびプローブは, NoVGI 検出用には COG1F/COG1R (100 pmol/μl), RING1-TP (a) (30 pmol/μl), NoVGII 検出用には COG2F/COG2R (100 pmol/μl), RING2-TP (10 pmol/μl) を用

い、PCR 反応は、50℃2 分、95℃10 分の後、94℃15 秒、56℃1 分を 45 サイクルにより行った。国立感染症研究所から分与された GI および GII の標的領域を組み込んだプラスミド DNA を、 10^7 から 10^0 コピーまで 10 倍段階希釈系列を作製して試料と同時に検査し、得られた検量線から糞便試料 1g 当たりの NoV 遺伝子コピー数を算出した。リアルタイム PCR 測定時に 1 ウェル（1 試料）当たり 10 コピー以下を陰性と判定した。

II-2-3 検出されたNoVの遺伝子解析

上記の方法により NoV 陽性と判定した材料について、遺伝子解析を行った。検出された NoV GI の解析には COG1F/G1SKR、GII には COG2F/G2SKR²⁰⁾ の領域を対象とした RT-PCR 法を行い、PCR 産物を Montage-PCR (Millipore) を用いて精製し、Big Dye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) によるシーケンス反応を行った。反応産物を Centri Sep Spin Columns (Applied Biosystems) を用いて精製し、ABI PRISMTM Genetic Analyzer 3100 (Applied Biosystems) により塩基配列を決定した。得られた塩基配列は Clustal X によりアライメントを作成し、boot strap=1,000 として近隣結合法による遺伝子系統樹解析²¹⁾から遺伝子型を判定した。

II-2-4 ノロウイルス以外の胃腸炎起因ウイルスの検索

SaV は、Honma らの方法²²⁾に準じて RT-PCR 法により検査を行った。A 群 RV はロタクロン (TFB)、腸管アデノウイルスはアデノクロン E (TFB)、AstV は Amplified IDEIA Astrovirus キット (DAKO) を用いた酵素抗体法、C 群 RV は RPHA 法による C 群ロタウイルス検出用試薬（デンカ生研）を用いて検査した。各市販キットによるウイルス検索は、添付書類の術式に準じて行った。

Ⅱ-3 結果

Ⅱ-3-1 胃腸炎集団事例からのウイルス検出状況

調査期間の4年間に胃腸炎集団発生2,670事例のふん便や食品材料等24,798件についてウイルスの検出を行った結果、1,422事例(53.3%)、検査材料は7,766件(31.3%)から病原因子が検出された(表1, 2)。ウイルス陽性となった1,422事例のうちNoVGIIが検出されたのは1,146事例(80.6%)と最も多く、次いでNoVGIが117事例(8.2%)、NoVGI+GIIが86事例(6.0%)、SaVが42事例、A群RVが22事例、AstVが5事例、C群RVが4事例であった。リアルタイムPCR法にNoV検査法を変えた2006年から2009年のNoV陽性率は45.4%(2009年)～64.9%(2006年)、平均53.3%であった。

← 表1

検査材料別のウイルス検出状況を表2に示した。ウイルス検出率は患者材料が最も高く13,069件中6,848件(52.4%)、次いで非発症者1,435件中218件(15.2%)、調理施設従業員8,525件中690件(8.1%)、食品材料3,822件中10件(0.3%)の順であった。東京都では検索対象の約半分が患者材料、約30%が調理従事者、約20%が非発症者と食品材料で占められている。この割合は調査期間中、変化がなかった。

← 表2

Ⅱ-3-2 検出されたNoVの遺伝子型

2006年から2009年に検出されたNoVのうち、解析可能であった834株について遺伝子解析を実施した(表3)。遺伝子型で最も多かったのはGII/4で504株(60.8%)、次いでGI/4が73株(8.7%)、GII/2が59株(7.0%)、GII/3が46株(5.5%)、GII/13が43株(5.1%)、GII/6が39株(4.7%)の順であり、これらを含めてGIが9種類とGIIが15種類の合計24種類の遺伝子型が確認された。

← 表3

集団発生の原因施設別に検出されたNoVの遺伝子型を見ると利用者

が低年齢層の施設（保育園・幼稚園・小学校）では検出 NoV のうち GII/4 が占める割合が低かったが，その他の施設では検出された NoV の 50% 以上が GII/4 であった(表 4)。



II-4 考察

著者らは，厚労省の通知に従って NoV 検索方法を RT-PCR 法からリアルタイム PCR 法に変更したが，NoV 検出状況に大きな変化はなかった。例年，検索対象の約半分が患者材料，約 30%が調理従事者，約 20%が非発症者と食品材料で占められ、リアルタイム PCR 法と RT-PCR 法による NoV 陽性率はほぼ同等であった（第 1 章表 3，第 2 章表 2）。リアルタイム PCR 法の有用性は，試料と試薬をプレート上で混合した後に密封し反応終了まで開封することがないため，陽性材料による試料汚染の心配がないことである。

検出された NoV のうち、遺伝子型の解析が可能であった 834 株のうち GI は 99 株，GII は 735 株であった。遺伝子型をみると GII/4 が全体の 60.8%を占めたが，この割合には年次推移が認められた。2006 年と 2007 年には GII/4 が 70～80%程度を占めたが，2008 年と 2009 年は 50%前後まで減少した。このことは，集団事例の発生施設の推移と関連してくる。厚労省の通知²³⁾により，集団発生施設の統計が集計されており，これと対比すると高齢者施設における集団事例数の減少に伴って GII/4 の占める割合が低下していた。一方，保育園，幼稚園，小学校等における集団発生では様々な遺伝子型の NoV が検出され，集団発生施設数における低年齢層が利用する施設での集団事例数の割合は高まっており，高齢者施設における NoV 防止対策の進展に比べ，保育園や小学校における流行防止効果が十分発揮されていないと推察される。低年齢層の施設における

NoV 防止対策を進めることが今後必要な課題と考えられた。

NoV の分類は、科 (Family) 属 (Genus) 種 (Species) まで国際ウイルス命名委員会 (ICTV) により決定されているが、更に詳細な遺伝子型について ICTV は関与しない。NoV の遺伝子型は、主として NoV 構造蛋白質領域の塩基配列に基づき行われているが、米国¹²⁾、欧州 (<http://www.noronet.nl/database/>)、日本²⁰⁾では異なった分別手法が行われてきた。NoV 遺伝子型別の国際標準化に関して、2010 年第 4 回国際カリシウイルス学会 (チリ：サンタクルス) で協議が行われ、①VP1 領域¹²⁾の塩基配列による遺伝子型別、②解析領域は VP1 全領域、③遺伝子型の表示方法は協議、④遺伝子組み換え型 NoV の呼称はキメラウイルス、⑤ORF1 (非構造蛋白質) 領域の遺伝子型別も提言、⑥新たな遺伝子型別法の投稿、⑦ヒト由来と動物由来 NoV を区別しないで報告順に遺伝子型番号を付与、が合意された²⁴⁾。これらの情報に留意しつつ、NoV 遺伝子解析を行う必要がある。流行株の遺伝子解析は、これから実現する可能性のある NoV ワクチン開発に必要な情報を提供する。今後も NoV 流行情況の監視と遺伝子解析を継続し、NoV 集団発生防止対策に活用していく必要がある。

II-5 結論

厚生労働省の通知¹¹⁾に従ってNoV検査法を2006年1月からリアルタイムPCR法に変更したが、NoV検出率はそれまで実施してきたRT-PCR法と同等であった。検出されたNoV遺伝子解析の結果、患者年齢層により検出される遺伝子型に特徴があり、高齢者施設においてGII/4による集団発生が多発したことが明らかにされた。

表1. 都内の胃腸炎集団発生からのウイルス検査成績

検出ウイルス	2006年	2007年	2008年	2009年	合計
ノロウイルス GI	18	7	51	41	117
ノロウイルス GII	397	248	288	213	1146
ノロウイルス GI+GII	23	9	35	19	86
サボウイルス	2	12	18	10	42
A群ロタウイルス	4	4	12	2	22
C群ロタウイルス			4		4
アストロウイルス	1		1	3	5
合計	445	280	409	288	1422
検出率 (%)	(64.9)	(53.5)	(49.5)	(45.4)	(53.3)
検査事例数	686	523	826	635	2670

表2. 検査材料別のウイルス検査成績

検査材料	2006年	2007年	2008年	2009年	合計
患者 陽性数	2368	1177	1614	1689	6848
陽性率 (%)	(53.7)	(46.8)	(54.1)	(53.3)	(52.4)
検体数	4408	2513	2982	3166	13069
従業員 陽性数	238	145	130	177	690
陽性率 (%)	(9.2)	(7.9)	(6.9)	(7.9)	(8.1)
検体数	2588	1824	1885	2228	8525
非発症者 陽性数	60	30	47	81	218
陽性率 (%)	(13.5)	(17.9)	(13.7)	(16.9)	(15.2)
検体数	444	168	343	480	1435
食品 陽性数	0	0	1	9	10
陽性率 (%)	(0)	(0)	(0.1)	(0.9)	(0.3)
検体数	1158	770	861	1033	3822
合計 陽性数	2666	1352	1792	1956	7766
陽性率 (%)	(31.0)	(25.6)	(29.5)	(28.3)	(31.3)
検体数	8598	5275	6071	6907	24798

表3. 検出されたノロウイルスの遺伝子型の年次推移

遺伝子型	2006年	2007年	2008年	2009年	合計
GI	1			3	3
	2			1	1
	3	1	7	1	9
	4	8	28	37	73
	7			3	3
	8	2	3	11	17
	10	1			1
	11		2		2
	14		1		1
GII	1	1			1
	2	3	7	42	59
	3	10	29	7	46
	4	95	139	144	501
	5			1	1
	6	1	1	32	40
	7	1	1	3	5
	9	1	2		5
	10		1		2
	12		7	13	20
	13	1	25	2	36
	14			5	5
	15			1	1
	17		1		1
	19		1		1
合計	115	190	249	280	834

表4. 検出されたノロウイルスの遺伝子型 (施設別)

遺伝子型	保育園 幼稚園 小学校	高齢者 病院	飲食店	会食料理 宿泊施設	家庭内・ その他	合計
GI	1		2	1		3
	2		1			1
	3	2	4	1	2	9
	4	24	1	31	9	73
	7	1	2			3
	8	7	6	2	2	17
	10	1				1
	11		1		1	2
	14	1				1
GII	1				1	1
	2	26	2	21	3	59
	3	25	5	11	2	46
	4	65	190	118	92	501
	5	23	3	7	4	1
	6		1			40
	7	1	1	2	1	5
	9	1	1	2		5
	10			1	1	2
	12	2		12	5	20
	13	25	2	7	6	36
	14		3	1	1	5
	15			1		1
	17		1			1
	19			1	1	1
合計	204	206	220	130	74	834

第3章 ノロウイルス食中毒事例における遺伝子解析 による原因追究

Ⅲ－１ 緒言

食品衛生法の食中毒病因物質に NoV が加えられた直後は、カキ等の二枚貝が原因食品であることが多かったが、近年、東京都内では NoV を排出する調理従事者によって汚染された食品に起因する食中毒事例が増加傾向にある²⁵⁾。2004 年 1 月に放送番組の制作現場で発生した集団食中毒事例では、都内 7 ヶ所の食品製造事業所が弁当調製を担当し、患者と複数の弁当調製施設の調理従事者から NoV が検出された。このため、ウイルス検出成績から食中毒の発生原因施設等を特定することができなかったので、検出されたウイルスの遺伝子解析により原因施設を特定することを試みた。

Ⅲ－２ 材料と方法

Ⅲ-2-1 調査対象

調査対象とした食中毒患者の症例定義は、放送番組制作期間中に提供された弁当を喫食後に嘔気、嘔吐、下痢、腹痛、発熱のうち 2 つ以上を示した者と定義づけて、管轄保健所が疫学調査を行った。検査材料が得られた患者糞便 35 件、7 ヶ所の弁当調製施設の従業員糞便 73 件、食品 27 件について胃腸炎起因ウイルスの検索を行った。

検査は、「食品衛生法」(58 条 2 項)、「食品衛生施行令」(36 条)、「感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律」(感染症法 15 条)に基づいて行うものであり、東京都健康安全研究センター倫理審査委員会の承認を取り、倫理面への配慮を行った。

表1. 弁当を原因食とした胃腸炎集団発生の概要

発生施設：放送番組制作現場・放送局

- 発生日時：2004年1月3日0時～1月6日19時
共通食材：12月31日から1月3日までの朝食、
昼食の弁当
 - 弁当製造施設：7事業所
弁当最大発注数：705個
発症者：19部署96名
 - 主症状：嘔気(83.3%)、嘔吐(57.8%)
下痢(78.4%)、腹痛(55.9%)、発熱(58.8%)
-

Ⅲ-2-2 事例の概要

胃腸炎集団発生の概要を表1に示した。2004年1月に、放送番組を制作した民間放送局の中継現場および本社など19部署で従事した職員96名が胃腸炎症状を呈した。主な症状は、嘔気(83.3%)、嘔吐(57.8%)、下痢(78.4%)、腹痛(55.9%)、発熱(58.8%)であった。

← 表1

患者は1月3日午前0時から1月6日19時にかけて発生し、96名のうち62名(64.6%)は1月3日午後に集中した一峰性の発症状況を示した(図1)。共通食は放送番組制作期間中に配られた朝食および昼食用の弁当に限定され、原因食品としてこれらの弁当が疑われた。

← 図1

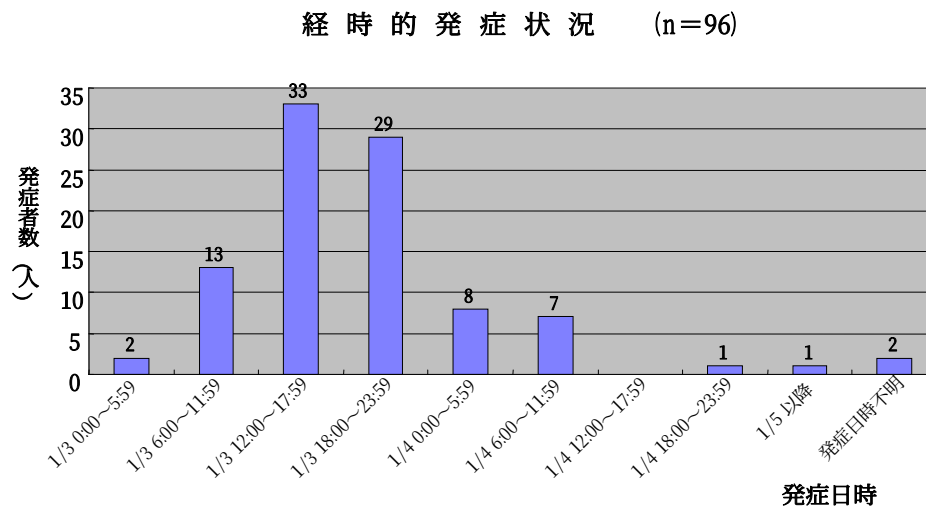


図1. 患者の経時的発症状況

患者 96 名の発症日時を 6 時間毎にグラフ化した。嘔気、嘔吐、下痢、腹痛、発熱のいずれかの症状を最初に示した時を発症時間とした。

Ⅲ-2-3 検査材料の前処理

患者と調理従事者の糞便は、超遠心により粗精製と濃縮を行った¹⁵⁾。その概要は、糞便約 1g に PBS (－) (pH7. 2：日水製薬)を加えて 10% 乳剤を調整し、低速遠心(3,000rpm 15 分：Hitachi CF15)、冷却高速遠心 (8,000rpm 30 分：Himac 20)を順次行った後の上清を冷却超遠心 (27,000rpm 180 分：Himac 80β)した。得られた沈殿を 400μl の Tris-NaCl 緩衝液(0.01M Tris-HCl, 0.15 M NaCl, pH7. 2)に再浮遊し、核酸抽出材料とした。

食品は、約 1g をストマッカー袋に入れて PBS (－)を加え、ストマッカー (ELMEX Pro-media SH-001) により 10%乳剤を調整した。以後の前処理は糞便材料と同様に行った。

Ⅲ-2-4 核酸抽出

核酸抽出は CTAB 法¹⁵⁾で行い、術式は I 章の材料と方法 I -2-3 と同様に行った。

Ⅲ-2-5 RT-PCR 法による NoV 遺伝子の検出

NoV 遺伝子の検出は、ORF1 のポリメラーゼ領域¹²⁾を増幅して行った。逆転写反応に用いたプライマーは COG1R・COG2R²⁶⁾、1st PCR の 5'側には NV36・MR3、2nd PCR には NV82・LV82・SM82・NV3／NV81・SR33²⁷⁾である。PCR 産物は 2%アガロースゲル(TAKARA)で電気泳動後、エチジウムブロマイド染色し、UV 照射により増幅バンドを確認した。

Ⅲ-2-6 NoV 遺伝子の塩基配列の決定

検出されたNoV遺伝子の塩基配列の決定は、第2章Ⅱ-2-4と同様に実施した。

Ⅲ-2-7 NoV 以外の胃腸炎起因ウイルスの検索

NoV以外の胃腸炎起因ウイルスの検索は、第2章Ⅱ-2-5と同様に実施した。

Ⅲ-3 結果

Ⅲ-3-1 胃腸炎ウイルスの検索成績

患者糞便 35 件中 21 件、調理従事者糞便（非発症）73 件中 9 件から NoV を検出したが、食品 27 件から NoV を検出することはできなかった（表 2）。

← 表 2

調理従事者が NoV 陽性となったのは、7ヶ所の調理施設のうち 3ヶ所（C 施設 1 名、D 施設 3 名、E 施設 5 名）であった。また、NoV 以外の胃腸炎起因ウイルスは、いずれの検体からも検出されなかった。

表2. 弁当製造施設関連食中毒のウイルス検索成績

対象施設	検査材料	検査例数	ノロウイルス 陽性数
放送局	患者糞便	35	21
	非発症者糞便	1	0
弁当製造施設 (7施設)	検食	27	0
	従業員糞便	73	9

Ⅲ-3-2 検出された NoV の遺伝子解析

患者 21 名と 3 ヶ所の調理従事者 9 名から検出された NoV 遺伝子の塩基配列を比較した結果、患者由来の 21 株および D 施設の調理従事者 2 名の由来株の塩基配列は完全に一致し、genotype II の Bristol 類似株²⁸⁾であった(図 2)。しかし、他の調理従事者 7 名由来株は genogroup I が 1 株と genogroup II 6 株に分類され、患者由来株と異なっていた。これら 7 株と患者由来株の相同性は 58.6～95.5%であった(表 3)。

図 2

表 3

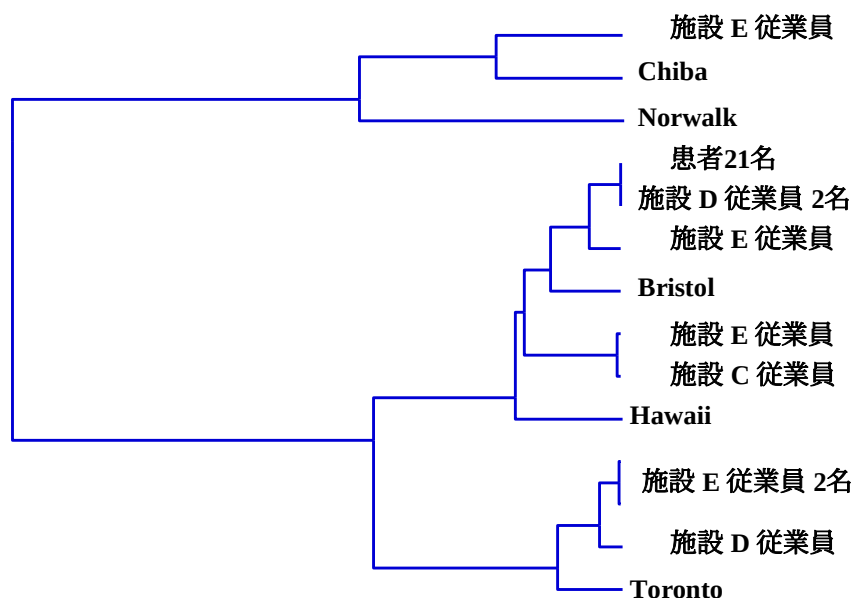


図2. 検出されたノロウイルスの系統樹解析

患者 21 名と弁当調整施設 C(1 名), D(3 名), E(5 名)の調理従事者から検出されたノロウイルスの構造蛋白質領域の塩基配列を決定し, 系統樹解析を実施した。比較対象とした Norwalk, Chiba 株は GI, Bristol, Hawaii, Toronto 株は GII である。

系統樹解析の結果, 患者由来の 21 株は全て同一の塩基配列であり, 単一汚染された原因食品に起因する食中毒事件であることが判明した。ノロウイルスが検出された弁当調整施設 D の従業員 3 名のうち 2 名由来株は, 患者由来株の塩基配列と完全に一致した。本食中毒事件は, 施設 D の調理従事者による弁当のノロウイルス汚染が原因と断定された。

表3. 代表株と患者および調理者由来株の相同性

代表株	代表株との 相同性 (%)	材料の由来／株数			
		患者	施設 C	施設 D	施設 E
Bristol	91.1	21(100)		2(100)	
	90.8				1(95.8)
	89.7				1(86.0)
	89.0		1(85.2)		
Toronto	95.8				2(75.8)
	93.8			1(75.7)	
Chiba	88.5				1(58.6)

()内の数値 : 患者株との相同性 (%)

Ⅲ－４ 考察

NoV による食中毒事例の主な発生原因として、ウイルスに汚染されたカキやシジミ等の二枚貝による場合^{29,30)}と、ウイルスを排出する調理従事者による食品汚染に起因する場合^{31,32)}が考えられる。魚介類を生食する機会の多い我が国では、NoV に汚染されたカキやシジミ等の二枚貝を推定原因食とした食中毒が毎年発生している。東京都の食中毒統計¹⁸⁾によれば、食品衛生法の食中毒病因物質に NoV が加えられた直後は、ウイルスに汚染された二枚貝を原因食品とする事例が約半数を占めていたが、最近はその割合が低下している。2004 年には二枚貝による事例が食中毒事例の 20%程度まで減少する一方、ウイルスを排出する調理従事者に起因する事例が増加している²⁵⁾。このような背景において本事例は発生し、近年増加している調理従事者による食品汚染に起因する食中毒事例の 1 つであった。

本事例では患者と調理従事者から NoV が検出されたが、推定原因食品の弁当から NoV は検出されず、また NoV 陽性となった調理従事者は 3 施設 9 名に及んだことから、疫学調査とウイルス検索成績のみでは原因施設を特定することはできなかった。しかし、遺伝子解析によりウイルスが検出された患者 21 名全員と D 施設の調理従事者 2 名から検出されたウイルスの遺伝子配列が完全に一致したこと、患者はいずれも 1 月 2 日に配布された朝・昼の弁当を食べていること、および 1 月 3 日正午から深夜にかけて患者の発生が集中したことから、1 月 2 日の朝食・昼食用に調製された D 施設の弁当を原因とする NoV 食中毒と断定された。NoV 汚染の原因については、調理従事者も原因食品の喫食により同時に感染していたかは不明ではあるが、調理従事者による食品汚染も疑われた。検出された NoV の遺伝子解析の結果、NoV の 2004/2005 流行期に国内および欧米で広く流行した Bristol 類似株であることが判明した。

NoV は遺伝子群 I ～ V (G I ～G V) に分類¹²⁾され、ヒトから検出されるノロウイルスの多くは G I と G II であり、G I は 14 種類、G II は 19 種類以上の遺伝子型²³⁾に分類されている。近年、大幅に増加したノロウイルス食中毒に対して厚生労働省は 2007 年 8 月に薬事・食品衛生審議会食品衛生分科会食中毒部会を開催し、「ノロウイルス食中毒対策（提言）」を取りまとめた。この中で、食中毒判断根拠の明確化にノロウイルス遺伝子型調査を求めている。調理従事者による食品汚染や介護者を介した感染事例が増加していることから、食中毒原因施設の特定や集団発生事例の感染経路および感染(汚染)源の追及にノロウイルスの遺伝子型調査が必須となる事例が増加すると予想される。今後のノロウイルス検索において、検出されたノロウイルスの遺伝子解析を進め、流行しているノロウイルス遺伝子型情報を蓄積していくことが重要であると考えられた。

Ⅲ－５ 結論

2004 年 1 月に放送番組の制作現場で発生した集団食中毒事例では、都内 7 ヶ所の食品製造事業所が弁当調製を担当し、患者と複数の弁当調製施設の調理従事者から NoV が検出された。このためウイルス検出成績から食中毒の発生原因を解明することは困難であったが、検出されたウイルスの遺伝子解析により原因施設を特定することができた。調理従事者による食品汚染に起因する NoV 食中毒の増加を踏まえ、2007 年食品衛生審議会答申において NoV 食中毒の原因解明に検出ウイルスの塩基配列比較を重視することが示された。本事例は、単に NoV 陽性、陰性を判定するだけの定性的検査から、検出ウイルスの塩基配列比較が必要となり、NoV 検査の質の転換を必要とするものであった。

第4章 吐物によると思われたノロウイルス集団発生例の 感染源の検討

IV-1 緒言

NoV は、冬季を中心に乳幼児から高齢者まで全ての年齢層で胃腸炎¹²⁾を引き起こす最も重要な病原因子である。NoV はヒトからヒトへ直接感染、あるいはウイルス汚染された食品や水を介して感染する²⁵⁾。NoV に起因する胃腸集団事例は保育園³³⁾、高齢者介護施設³⁴⁾、入院病棟³⁵⁾の他、外洋航海船³⁶⁾、激しい接触を伴うスポーツゲーム中³⁷⁾など様々な施設および状況で発生している。近年、NoV 患者の吐物によって環境が汚染され、乾燥した吐物に含まれたウイルスによって感染拡大した事例が報告されている^{38,39)}。しかし、施設内におけるウイルス汚染拡大状況や集団発生要因について詳細な検討は少ない。

2006 年 12 月に東京都内のホテル内で披露宴参加者 1 名が施設内 2 ヶ所で嘔吐し、これを発端とした複数グループの披露宴利用者 372 名とホテル従業員 72 名、合計 444 名の胃腸炎集団事例が発生した。この集団事例は、施設内の空調機が感染拡大に寄与したと考えられたことから、感染源の検討を行った。

IV-2 材料と方法

IV-2-1 事例の概要

集団発生施設の設備調査および疫学調査³⁹⁾は、管轄する東京都豊島区池袋保健所が実施した。この調査成績によると、2006 年 12 月 2 日から 12 月 10 日に東京都内のホテル内宴会場を利用した 372 名とホテル従業員 72 名、合計 444 名が嘔吐、下痢等の胃腸炎症状を呈した(表 1)。

表 1

表1. 事例の概要

-
- 発生日時：2006年12月2日～10日
ホテル宴会場利用者 推定利用者数4,000～5,000人／日
 - 1F： ロビー、レストラン
 - 2F： レストラン、宴会場、菓子厨房
 - 3F： 宴会場、主厨房
 - 4F： 宴会場、結婚式場、プール
 - 5～24F： 客室（815室）
 - 25F： 宴会場、レストラン
 - 地下1階： 従業員食堂
 - 患者数：利用者372名、従業員 72名 合計444名
 - 利用者が12月2日11:00AM 3F、11:30AM 25F廊下で嘔吐
 - 発症者は3階と25階利用者に集中
-

当該ホテルはレストランが1階、2階、25階、宴会場は2～4階と25階、厨房は2階、3階、25階にあり、従業員食堂は地下1階、5階～24階には客室815室がある。

12月2日披露宴会場利用者1名が午前11:00頃に3階控室と、午前11:30頃に25階宴会場前の廊下で嘔吐し、この利用者は3階と25階のトイレを利用した後に帰宅し、披露宴には参加していない。25階は宴会場サービス従業員がテーブルナプキンで吐物処理を素手で行い、吐物は従業員専用エリアのゴミ箱に廃棄した。3階と25階嘔吐場所のカーペットは清掃員がゴム手袋を着用し、洗剤とブラシを用いて清掃を行った。

当該施設では12月5日に厨房の消毒を行い、12月6日から12月13日まで3階主厨房と25階レストランの使用を停止した。調査の過程で宴会利用者が施設内で嘔吐したことが判明し、12月7日に嘔吐場所とトイレの消毒を実施した。

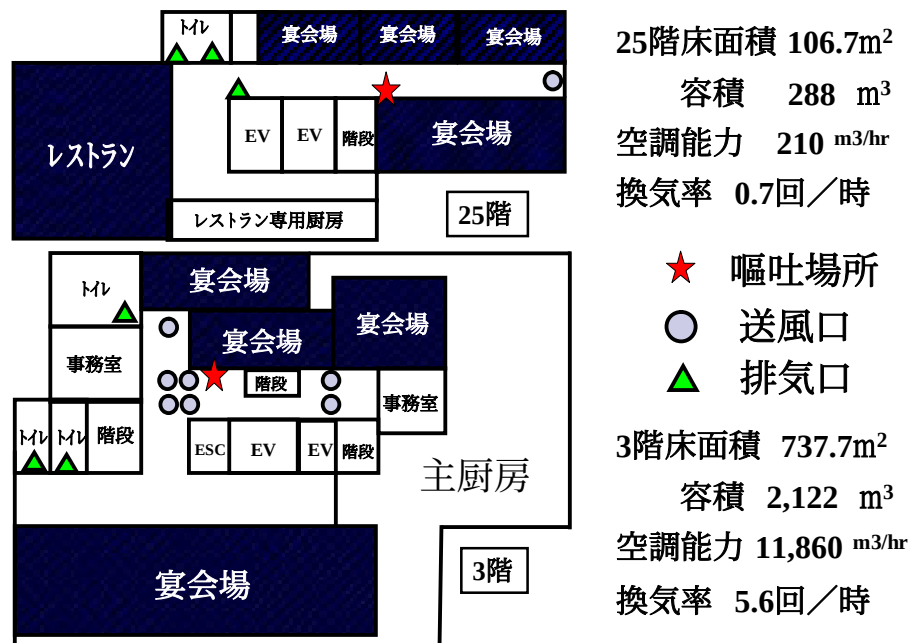


図1. 集団事例発生施設の見取図

披露宴会場利用者1名が嘔吐した場所と披露宴会場の空調設備の見取図。患者発生が短期間で収束した3階は空調能力が高く、患者発生が長期化した25階の空調能力は3階の1/8であり、送風口も廊下の端に1ヶ所しかなかった。患者発生は3階と25階の全ての宴会場およびレストランで認められた。

ホテル内の廊下と宴会場はカーペットが敷かれ、宴会場および各階廊下の空調は独立制御であった。3階廊下は床面積733.7m²、容積2,128m³、換気能力は毎時11,860m³であった。25階廊下は床面積106.7m²、容積288m³、換気能力は毎時210m³であり、3階と25階の換気回数はそれぞれ毎時5.6回と0.7回であった(図1)。

← 図1

IV-2-2 利用フロア・施設利用日別の患者発生状況

疫学調査成績から、ホテル各フロアにおける利用者数、患者数および患者発生率を表2に示した。

← 表2

施設を利用した患者372名中361名(97.0%)は3階と25階の利用者

表2. 3階と25階の利用フロア・施設利用日別の患者発生率

利用フロア	06・12・2	3	4	5	6	7	8	9	10	合計
3階 発症者	136	25	1	0	1	0	0	0	0	163
3階 利用者	951	328	182	360	342	230	499	814	980	4913
3階 患者発生率	14.3	7.6	0.5	0	0.3	0	0	0	0	4.8
25階 発症者	34	42	15	13	11	0	9	0	0	124
25階 利用者	88	68	40	60	65	112	115	170	21	739
25階 患者発生率	38.6	61.8	37.5	21.7	16.9	0	7.8	0	0	16.8
3/25階 発症者	51	8	0	0	0	0	0	0	15	74
3/25階 利用者	96	30	0	0	0	0	0	0	101	227
3/25階 患者発生率	53.1	26.6	-	-	-	-	-	-	14.9	32.6
合計 発症者	221	75	16	13	12	0	9	0	15	361
合計 利用者	1135	426	238	420	407	342	614	984	1102	5879
合計 患者発生率	19.5	17.6	6.7	3.1	2.9	0	1.5	0	1.4	6.1

に集中していた。施設利用日別の患者発生率は12月2日が最も高く19.5%であり、以後12月6日には2.9%まで低下した。患者発生は12月8日と12月10日利用者にそれぞれ9名と15名認められたが、それ以後の発生はなく流行は終息した。利用階別の患者発生率は大きく異なり、3階利用者の患者発生率が10%を超えたのは12月2日(14.3%)の1日に限定されたが、25階利用者の患者発生率は12月2日から6日まで順に38.6%、61.8%、37.5%、21.7%、16.9%であり、5日間に及んだ。施設2階、3階、25階に厨房があり、和食、洋食、中華料理が提供されたが、提供料理による患者発生に偏りは認められなかった。

IV-2-3 検査材料

宴会場を利用した患者ふん便92件、ホテル従業員ふん便98件(発症者13件、非発症者85件)について胃腸炎起因ウイルスの検索を行った。12月2日に施設内3階と25階で嘔吐した施設利用者の検査材料は、確保す

ることができなかった。

検査は、「食品衛生法」(58 条 2 項),「食品衛生施行令」(36 条),「感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律」(感染症法 15 条)に基づいて行うものであり,東京都健康安全研究センター倫理審査委員会の承認を取り,倫理面への配慮を行った。

IV-2-4 リアルタイム PCR 法による NoV 検索

リアルタイムPCR法によるNoV検索の術式はⅡ-2-3-1検査材料の前処理,Ⅱ-2-3-2核酸抽出,Ⅱ-2-3-3cDNA合成,Ⅱ-2-3-4リアルタイムPCR法と同様に実施した。

IV-2-5 検出されたNov遺伝子の解析

Ⅱ章に記述したNoVの遺伝子解析法と同様に実施した。

IV-2-6 その他の胃腸炎起因ウイルスの検索

SaVは,Oka らの方法⁴¹⁾によるリアルタイムPCR法により検査を行った。A群RVはラピッドテストロタ-アデノ(SEKISUI)を用いたイムノクロマト法,C群RVはC群ロタウイルス検出用試薬(デンカ生研)を用いたR-PHA法,AstVについては,Amplified IDEIA Astrovirus キット

(DAKO)を用いた酵素抗体法により検査を行った。各市販キットの操作手順は,添付の説明書に従った。

IV-3 結果

IV-3-1 ノロウイルス検索成績

施設利用者の患者 92 名と従業員 98 名のふん便材料について胃腸炎起因ウイルスの検索を行い,患者 71 名(77.2%)と従業員 15 名から NoV が検出された(表 3)。

← 表 3

各フロア担当の施設従業員について NoV 陽性率を比較すると,25 階

表3. 胃腸炎集団発生からのウイルス検索成績

検査材料		検体数	ノロウイルス 陽性数	陽性率 (%)
宴会場利用患者		92	71	77.2
調理 従事者	3階 主厨房	60	3	5.0
	25階 レストラン	10	4	40.0
	B1階 従業員食堂	9	1	11.1
ウェ이터 (25階宴会場)		18	7	38.9
清掃		1	0	0
従業員合計		98	15	15.3

宴会場内サービスを担当する従業員からの NoV 陽性率は 38.9%, 調理従事者からは 8.9% (79 名中 8 名) であった。嘔吐場所のカーペットの清掃員は非発症であり, NoV は検出されなかった。また, 25 階廊下の嘔吐物処理を行った従業員は発症しており, NoV 陽性であった。

IV-3-2 検出されたノロウイルスの遺伝子解析

患者から検出された NoV71 株中 59 株と従業員由来の 15 株について遺伝子解析を実施した。患者由来 59 株中 58 株と従業員由来 15 株の塩基配列は 100%一致し, 遺伝子型は GII/4 型であり, 患者由来の 1 株は GII/12 型であった。

IV－4 考察

2006 年 12 月に、宴会場施設内での嘔吐を契機とした患者総数 444 名の大規模な胃腸炎集団発生があり、患者の発生は、施設利用者が嘔吐した 3 階と 25 階に集中し 372 名中 361 名(97.0%)となり、1 階、2 階と 4 階のレストランや宴会場利用者にはほとんど患者が認められなかった。嘔吐物を処理した宴会場サービス従業員を含む施設従業員と患者由来の NoV は同一であったことから、この集団発生の原因は 12 月 2 日に宴会場付近の廊下における嘔吐物と考えられた。患者由来 58 株と従業員由来 15 株の NoV の遺伝子型はいずれも GII/4 であり、この遺伝子型は 2006 年 NoV 流行期における主流行遺伝子型であった。残り 1 株の GII/12 型は、当該施設以外での感染と考えられた。

施設内での患者発生状況には差が認められ、患者発生が 1 日で減少した 3 階は換気率が毎時 5.6 回と高く、患者発生が 5 日間に及んだ 25 階の換気率は毎時 0.7 回であった。3 階においては高い換気率によりウイルス汚染濃度が低下し、短期間での患者発生率低下につながり、一方、25 階では低い換気率により環境中のウイルス濃度低下が遅れ、10%以上の患者発生率が 5 日間継続した要因になったと考えられた。

嘔吐物に起因する NoV 集団発生において最も重要なことは、汚染された物件、施設等を確実に、安全な方法、手段によりウイルスの不活化を行うことである。25 階の嘔吐物処理を行ったウェイターは素手で作業を行い、その後発症したが、カーペットの清掃を行った従業員はゴム手袋を着用していたため発症を免れ、ウイルス検査の結果も陰性であった。また、嘔吐場所の次亜塩素酸による消毒は、カーペットが汚染されてから 6 日目まで実施されていなかったことから、これが発症者 400 名を超える大きな胃腸炎集団発生に繋がったと考えられた。また、東京都が NoV

集団発生の増加に対応して行った「ノロウイルス対策緊急タスクフォース」⁴²⁾では、模擬嘔吐物を用いて吐物による汚染範囲を測定し、嘔吐場所から最大半径 1.9m 地点までウイルス汚染を確認している。高齢者施設、保育園、病院、披露宴会場等の NoV 集団事例が発生しやすい施設において、嘔吐物による施設内汚染が発生した場合には、次亜塩素酸による消毒を広範囲に行うよう注意喚起することが重要と考えられた。

IV－5 結論

2006 年 12 月に、宴会場施設内で患者総数 444 名の大規模な胃腸炎集団発生があり、患者と施設従業員から NoV が検出された。施設で提供された和食、洋食、中華料理によって患者発生に偏りはなく、披露宴利用者 1 名が施設 3 階と 25 階で嘔吐していた事が判明した。利用客の患者発生は、施設利用者が嘔吐した 3 階と 25 階に集中し、嘔吐物を処理した宴会場サービス従業員を含む施設従業員と患者由来の NoV は同一であったことから、この集団発生の原因は 12 月 2 日に宴会場付近の廊下を汚染した嘔吐物と考えられた。嘔吐場所の次亜塩素酸による消毒は、施設汚染が発生後 6 日目まで実施されていなかったことから、発症者 400 名を超える大きな胃腸炎集団発生に繋がったと考えられた。高齢者施設、保育園、病院、披露宴会場等の NoV 集団事例が発生しやすい施設において、嘔吐物による施設内汚染が発生した場合には次亜塩素酸による消毒を広範囲に行うよう注意喚起することが重要と考えられた。

第4章 無症状ノロウイルス感染調理従事者の ノロウイルス排泄期間と排泄量

V-1 緒言

NoV が糞便から検出された無症状キャリアー調理従事者が再び調理に従事するには、感染源となりうることから食中毒防止対策を進める上で陰性確認が必要である。しかし、調理従事者の NoV 遺伝子排出量および保有期間等に関する報告は少ない。本章では 2009 年 4 月から 2010 年 3 月の 1 年間に東京都内で発生した事例を対象としたウイルス検索において、NoV 陽性となった無症状調理従事者について陰性確認試験を行うことにより、NoV の排泄期間を明らかにしようとした。

V-2 材料と方法

V-2-1 検査材料

2009 年 4 月から 2010 年 3 月の間に発生した NoV による食中毒 10 事例に関連した無症状調理従事者 28 名の糞便 94 件を対象にした。

検査は、「食品衛生法」(58 条 2 項)、「食品衛生施行令」(36 条)、「感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律」(感染症法 15 条)に基づいて行うものであり、東京都健康安全研究センター倫理審査委員会の承認を取り、倫理面への配慮を行った。

V-2-2 リアルタイム PCR 法による NoV 検索

リアルタイムPCR法によるNoV検索の術式は第2章と同様であった。

V-2-3 検出されたNov遺伝子の解析

II 章において記載した II-2-4 検出された NoV の遺伝子解析、と同様に実施した。

V-3 結果

V-3-1 調査対象とした食中毒事例

調査期間中にNoVに起因する食中毒が67事例発生し、うち38事例において無症状の調理従事者からNoVが検出され、このうち調査が可能であった10事例の調理従事者28名についてNoV陰性確認試験を実施した。

調査対象とした事例は、飲食店での発生例が4事例、披露宴・法事等の会食料理提供施設で発生したものが4事例、仕出弁当やケータリング等の食品販売を行う施設で発生したものが2事例であった。各食中毒事例の原因となったNoVの遺伝子型はGII/2が1事例、GII/4が7事例、GII/7が1事例、GII/2とGII/13の同時検出例が1事例であった(表1)。

← 表 1

表1. 調査対象としたノロウイルス食中毒事件の一覧

事例 No.	発生 年月	喫食者数	患者数	発生施設	検査対象 調理従事者数	検出された NVの遺伝子型
1	2009.5	182	57	会食料理	5	GII/4
2	12	7	6	会食料理	6	GII/2,GII/13
3	12	不明	17	飲食店	1	GII/4
4	12	11	8	会食料理	1	GII/4
5	2010.1	45	29	仕出弁当	2	GII/4
6	1	22	12	ケータリング	1	GII/2
7	1	36	32	飲食店	6	GII/7
8	1	21	6	飲食店	1	GII/4
9	1	62	25	披露宴	2	GII/4
10	1	105	11	飲食店	3	GII/4

V-3-1 調理従事者のNoV陰性確認試験

調査対象とした10事例の調理従事者28名からのNoV陰性確認試験結果を表2に示した。推定原因食品が提供された4日後から8日後までに食中毒事件の原因解明のためにNoV検査を行った。その結果、調理従事者の糞便1g当たり 10^4 から 10^9 コピーのNoV遺伝子が検出された。陰性確認試験を目的とした検査材料の採取は1週間の間隔を基本とし、最短11日後から最長53日後に調査対象とした調理従事者全員のNoV陰性が確認された。28名中14名(50.0%)では、1回目の陰性確認試験によりNoVを排出していないことが確認された。

← 表 2

NoV陰性確認までに要した日数の度数分布と累積陰性確認率を図1に示した。

← 図 1

表2. 無症状調理従事者のノロウイルス陰性確認試験成績

食中毒事件No.－ 調理従事者No.	遺伝子型	初回検査 コピー数	ノロウイルス 陰性確認試験： コピー数					
			1回目	2回目	3回目	4回目	5回目	10回目
1-1	GII/4	3.3X10 ⁶ (5)*	ND (11)					
1-2		8.1X10 ⁷ (5)	ND (11)					
1-3		1.0X10 ⁹ (5)	1.4X10 ⁷ (11)	5.9X10 ⁵ (18)	ND (26)			
1-4		3.2X10 ⁸ (5)	4.2X10 ⁵ (11)	8.0X10 ⁴ (18)	2.1X10 ⁵ (26)	6.4X10 ⁴ (33)	ND (47)	
1-5		7.9X10 ⁸ (7)	1.7X10 ⁴ (11)	1.4X10 ⁵ (18)	2.1X10 ⁴ (26)	ND (33)		
2-1	GII/2	8.2X10 ⁶ (4)	9.7X10 ⁴ (10)	3.4X10 ⁵ (13)	ND (17)			
2-2		1.1X10 ⁶ (5)	7.0X10 ⁴ (10)	4.6X10 ⁴ (13)	ND (17)			
2-3		3.8X10 ⁷ (5)	6.9X10 ⁴ (10)	2.8X10 ⁴ (13)	4.0X10 ⁴ (16)	7.5X10 ⁴ (17)	ND (21)	
2-4	GII/13	4.3X10 ⁸ (5)	6.4X10 ⁴ (10)	4.5X10 ⁴ (13)	ND (17)			
2-5		3.5X10 ⁸ (5)	ND (16)					
2-6		9.3X10 ⁷ (7)	ND (21)					
3-1	GII/4	1.0X10 ⁵ (8)	ND (17)					
4-1	GII/4	2.1X10 ⁴ (8)	ND (17)					
5-1	GII/4	1.2X10 ⁷ (4)	ND (14)					
5-2		6.6X10 ⁷ (4)	ND (14)					
6-1	GII/2	1.1X10 ⁷ (6)	4.2X10 ⁵ (12)	ND (26)				
7-1	GII/7	3.9X10 ⁴ (4)	3.9X10 ⁴ (13)	ND (24)				
7-2		1.8X10 ⁵ (6)	ND (16)					
7-3		7.8X10 ⁵ (6)	3.4X10 ⁵ (16)	1.1X10 ⁶ (27)	ND (48)			
7-4		4.6X10 ⁴ (8)	ND (18)					
7-5		1.5X10 ⁵ (8)	ND (16)					
7-6		2.6X10 ⁵ (8)	ND (13)					
8-1	GII/4	9.0X10 ⁴ (4)	ND (16)					
9-1	GII/4	1.1X10 ⁷ (4)	9.6X10 ⁵ (12)	1.6X10 ⁵ (17)	1.1X10 ⁴ (24)	ND (34)		
9-2		1.6X10 ⁵ (5)	ND (12)					
10-1	GII/4	6.0X10 ⁴ (6)	6.0X10 ⁴ (11)	ND (17)				
10-2		2.0X10 ⁷ (7)	1.8X10 ⁵ (12)	2.8X10 ⁴ (18)	ND (21)			
10-3 **		2.0X10 ⁸ (6)	5.6X10 ⁴ (11)	3.5X10 ⁴ (17)	3.7X10 ⁴ (20)	1.4X10 ⁴ (25)	8.4X10 ⁴ (28)	ND (53)

* ()内の数字は推定原因食品が調理された後の経過日数, ND:検出せず

** 6回目: 2.8X10⁴(33), 7回目: 4.5X10⁴(39), 8回目: 2.5X10⁴(42), 9回目: 3.0X10⁴(47)

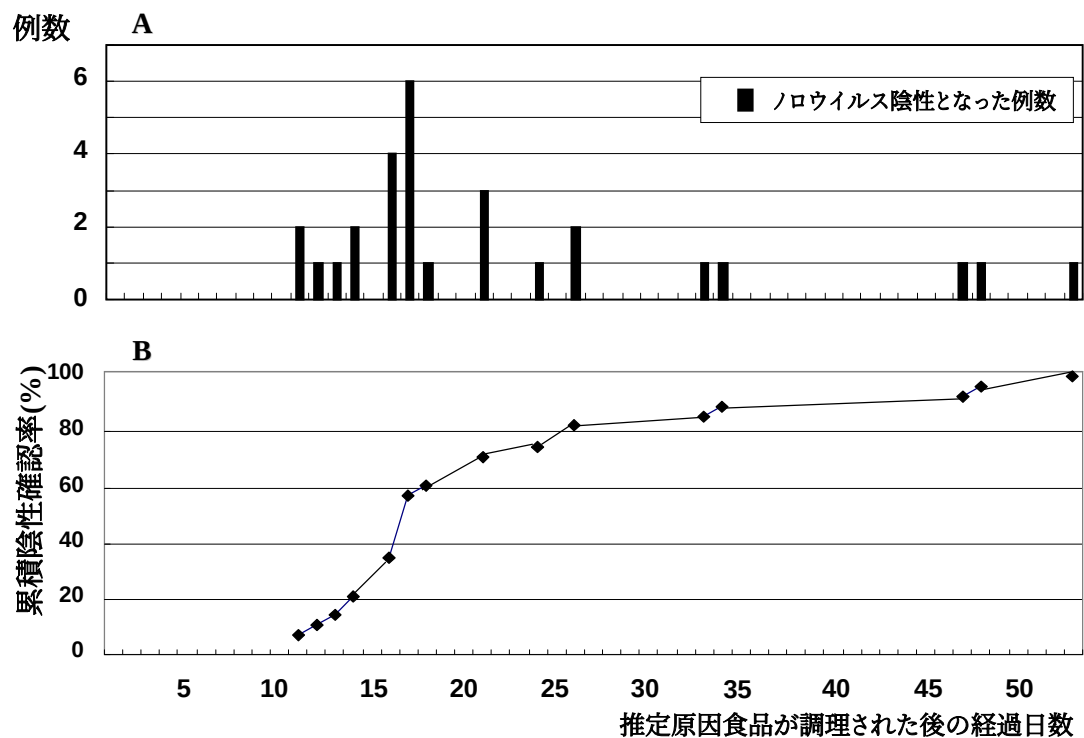


図1. 無症状調理従事者のノロウイルス陰性確認試験成績

ノロウイルス陽性となった調理従事者28名の陰性確認までに要した日数と、ノロウイルス陰性となった割合の累積値。

図1A：表2においてノロウイルスコピー数が検出限界以下となった日のヒストグラム。推定原因食品が提供された日を原点とし、検査材料採取日までの日数を経過日数とした。

図1B：経過日数までにノロウイルスコピー数が検出限界以下となった調理従事者の人数を累積し、割合(%)で示した。

17日目に陰性となった調理従事者が28名中6名（21.4%）で最も多く、次いで16日目の陰性確認者は4名（14.3%）であったが、陰性確認に33日から53日を要した調理従事者も5名（17.9%）認められた。18日目までの累積陰性確認者が17名となり、その累積陰性確認率は60.7%であった。この後は累積陰性確認率の増加傾向は低調となり、26日後82.4%、

47日後92.9%, 53日後に100%となった。

V-3-3 陰性確認試験におけるNoVコピー数の変動

NoV陰性が確認されるまでに要した日数によって18日以内17名（図2A）、21日から26日以内6名（図2B）、33日以上5名（図3）に分け、キャリア調理従事者のふん便中に排出されるNoV遺伝子コピー数を示した。18日以内にNoV陰性確認された調理従事者17名のうち、15名のふん便に排出されるNoVコピー数は図2Aに示したように、日数の経過と共に減少したが、陰性確認に21日から26日以内を要した群では、6例中2例でNoVコピー数が $10^4 \sim 10^9$ コピー/gの状態が1週間程度認められた後に陰性化した（図2B）。

← 図 2

また、陰性確認に33日以上を要した群では、最初のNoV検索において 7.8×10^6 から 7.9×10^8 /gコピーのNoV遺伝子が検出された後、原因食品が調理されて10日以上経過すると糞便中のNoV遺伝子コピー数は 1.7×10^4 から 9.6×10^5 /gまで減少し、NoVコピー数が $10^4 \sim 10^6$ /gの範囲で3週間から5週間継続した後に陰性化した（図3）。NoV排泄が1ヶ月以上続いた調理従事者から検出された遺伝子型は、GII/4(4名)とGII/7(1名)であった。

← 図 3

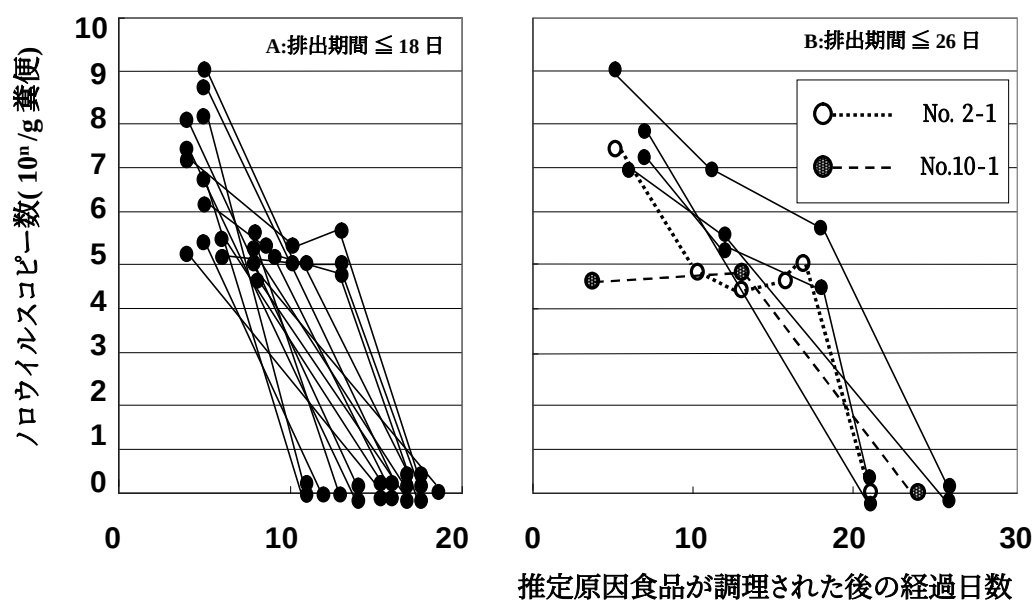


図2. 無症状調理従事者のノロウイルス排泄状況

ノロウイルスが陰性化するまでに 18 日以内 (図 2A:17 名), 19~26 日以内 (図 2B:6 名) を要した調理従事者のノロウイルス排泄状況。

図 2A : 17 名中 15 名は経過日数と共に糞便中のノロウイルスコピー数は低下した。

図 2B : 6 名中 2 名 (表 2 の事例-調理者 No 2-1 と 10-1) は、糞便中のノロウイルスコピー数が 10^5 コピー/g 糞便 前後で 1 週間から 10 日間, 停滞した。

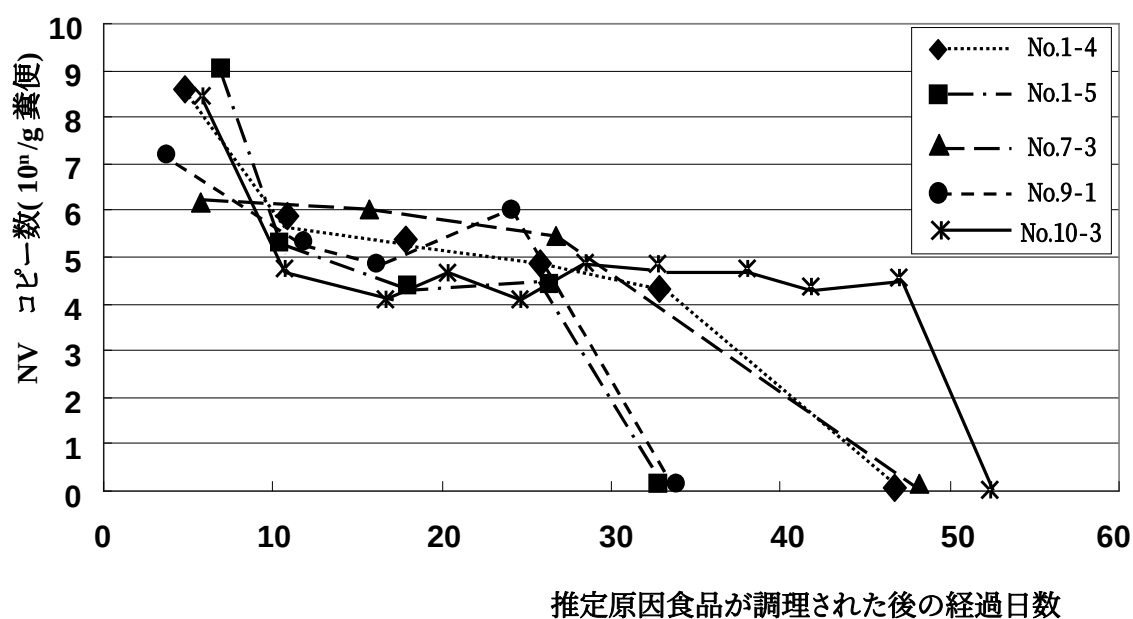


図3. ノロウイルス排泄が長期間に及んだ調理従事者の糞便中のウイルス量

ノロウイルスが陰性化するまでに33日以上を要した調理従事者5名のノロウイルス排泄状況。糞便中のノロウイルスコピー数が $10^4 \sim 10^6$ コピー/g糞便 前後で2週間から1ヶ月以上、停滞した。凡例は表2の事例-調理者Noを示す。

V-4 考察

2009年4月から2010年3月までに発生したNoV食中毒67事例のうち10事例の調理従事者28名の糞便94件について、NoV陰性確認試験を実施した。調査対象とした調理従事者は下痢等の胃腸炎症状はみられず健康状態は良好であり、病日の特定は出来なかった。しかし、調査対象は全て食中毒事例であり、推定原因食の喫食日は特定されており、本稿では推定原因食品が提供された日を基準とした経過日数で集計した。

NoV陰性が確認されるまでに要した日数は、11日～18日17名、21日

～26 日 6 名，33 日～53 日 5 名，平均 21.9 日であった。陰性確認試験は毎日実施されたものではないため，要した日数は過大評価されている面もあるが，長期にわたり NoV が排泄されていることは明らかである。杉枝ら⁴³⁾の報告では非発症の調理従事者 5 名についてふん便から経時的に NoV 検索を行い，このうち 3 名では 15 日後にも $10^4 \sim 10^7$ コピー/g の NoV を検出している。森ら⁴⁴⁾の報告では，調理従事者からふん便に排泄される平均ウイルス量は 2.03×10^4 コピー/g であり，13 名中 2 名では初回検査時から 22 日後と 32 日後に NoV を検出している。また，厚生労働省「ノロウイルスに関する Q&A」(www.mhlw.go.jp/topics/syokuchu/Kanren/yobou/0424-1.html，平成 23 年 5 月 29 日改定)では，NoV 陽性となった調理従事者は通常 1 週間，長い時は 1 ヶ月以上 NoV を排泄することが記載されている。今回の調査においても排出ウイルス量はこれまでの報告^{43,44)}と同様であり，NoV 陽性となった調理従事者 28 名中 5 名 (17.9%) では陰性確認されるまで 1 ヶ月以上の長期間を要した。

CDC は 2011 年にノロウイルス対策ガイドライン⁴⁵⁾を改定し，食品取扱者，保育・介護・医療関係者は症状回復後 48～72 時間の勤務制限を提示している。本調査において，NoV 排泄が 1 ヶ月以上続いた調理従事者のふん便に含まれる NoV コピー数は $10^4 \sim 10^6$ /g を維持し，NoV 感染拡大の原因となりうることを示した。同一の施設内給食を原因とした NoV 食中毒が業務停止を挟んで 2 回続けて発生し，各食中毒事件において調理従事者 1 名ずつから NoV を検出した事例⁴⁶⁾が東京都でみられている。この事例では，初回の食中毒の調理従事者と患者および 2 回目の事件の調理従事者と患者から検出された NoV の塩基配列は完全に一致し，同一ウイルスによる食中毒と考えられた。このような経験から，NoV 食中毒の拡大を防ぐためには検出感度の高い核酸増幅法による陰性確認検査を

実施し、陰性確認まで NoV 陽性となった調理従事者に対して就業制限を厳重に継続させねばならないであろう。

これまでに AIDS 患者や臓器移植等の免疫機能の低い患者から、長期間にわたって NoV が排泄され続ける症例が報告^{47,48)}されている。しかし、今回の調査では個人情報が十分得られていないため、被験者の免疫機能とウイルス排泄期間との関連は明確にできなかった。

また、近年 NoV 食中毒から検出される NoV の遺伝子型に変化が認められており、NoV 食中毒が多発した 2006/2007 流行期には検出される NoV の 90%以上が GII/4 であったが、最近は検出される NoV の中では GII/4 の占める割合は 50%以下に低下している⁴⁹⁾。今回の調査においても、NoV の排出が 1 ヶ月以上継続する調理従事者から検出された NoV の遺伝子型に GII/7 が混在し、様々な NoV 遺伝子型に起因する食中毒の増加が予想される。今後、NoV の長期排泄者に関しては、ウイルス側と宿主側の両面から検討する必要性が示された。

VI 結論

無症状調理従事者に起因する NoV 集団発生を防止するために、NoV 陰性確認試験を実施した結果、1 ヶ月以上に及んでウイルスを排泄する調理従事者の存在が確認された。長期ウイルス排泄者のウイルス量は低濃度 ($10^4 \sim 10^6$ /g 糞便) であり、遺伝子増幅法による検査が必要であった。2008 年厚生労働省の大量調理施設衛生管理マニュアルに示された調理従事者対策の重要性が確認された。

VII 総括

本研究において新たに設定したプライマーは多様な遺伝子型の NV を幅広く検出し、その高い有用性から現在、厚生労働省が提示する NV 検査法の標準プライマーとして記載されるようになった。また、近年増加している調理従事者によって汚染された食品に起因する NV 食中毒事件、吐瀉物を介した NV 集団発生について、検出ウイルスの遺伝子解析により食中毒事件の原因解明・集団発生の感染経路を解明することが出来た。2007 年 8 月に薬事・食品衛生審議会食品衛生分科会食中毒部会は「NV 食中毒対策（提言）」を取りまとめ、この中で食中毒判断根拠の明確化に NV 遺伝子型調査を求めており、本研究における遺伝子解析手法は、この「NV 食中毒対策（提言）」を先取りするものであった。さらに、調理従事者の NV 陰性確認検査から得られた知見は、NV による胃腸炎集団発生防止対策に重要であった。以上のことから、著者が考案・設定したプライマーを使用することによって NV の疫学的追究が可能となり、これによって NV 食中毒対策を有効に講じることが可能になったと考える。

文献

- 1) Kapikian Z.,Wyatt G.,Dolin R., et al.: Visualization by immune electron microscopy of a 27-nm particle associated with acute infectious non-bacterial gastroenteritis. *J.Virol.*,**10**, 1075-1081, 1972.
- 2) Chiba S., Sakuma Y., Kogasaka R., et al.: Fecal shedding of viruses in relation to the days of illness in infantile gastroenteritis due to Calicivirus. *J.Infec.Dis.*,**142**,247-249,1980.
- 3) Bishop R.F., Davidson G.P., Holmes I.H., et al.: Virus particles in epithelial cells of duodenal mucosa from children with acute non-bacterial gastroenteritis. *Lancet*, **2**, 1281-1283,1973.
- 4) Madeley C.R., Cosgrove B.P.: 28 nm particles in faeces in infantile gastroenteritis. *Lancet*, **2**,451-452,1975.
- 5) Flewett T.H., Bryden A.S., Davies H.: Epidemic viral enteritis in a long-stay children's ward. *Lancet*, **1**,4-5,1975.
- 6) Caul E.O., Appleton H.: The Electron microscopical and physical characteristics of small round human fecal viruses: an interim scheme for classification.*J.Med.Virol.*, **9**,257-265,1982.
- 7) Madore H.P., Treanor J.J., Pray K.A., et al.: Enzyme-linked immunosorbent assays for Snow Mountain and Norwalk agents of viral gastroenteritis.*J. Clin. Microbiol.*, **24**,456-459,1986.
- 8) Hayashi Y., Ando T., Utagawa T., et al.: Western blot(Immunoblot) assays of small, round-structured virus associated with an acute gastroenteritis outbreak in Tokyo.*J.Clin.Microbiol.*, **27**,1728-1733,1989.
- 9) Jiang X., Wang J., Estes M.K.: Norwalk virus genome cloning and characterization. *Science*, **250**: 1580-1583, 1990.

- 10) 厚生省，食衛第 155 号，1997.
- 11) 厚生労働省医薬食品局食品安全部監視安全課，食安監発第 1105001 号，2003.
- 12) Green K.Y.: *Caliciviridae: The Noroviruses*, *Fields Virology*, 949-979, Lippincott, 2007.
- 13) 林志直：遺伝子増幅法による SRSV の迅速診断法の開発．東京都立衛生研究所プロジェクト研究報告書，3-10, 1994.
- 14) 林志直，森功次，野口やよい，他：都内におけるノーウォーク様ウイルスに起因した胃腸炎集団事例の発生状況，東京衛研年報，**51**, 8-13, 2000.
- 15) Moe C.L., Gentsch J., Ando T., et al.: Application of PCR to detect Norwalk virus in fecal specimens from outbreaks of gastroenteritis. *J. Clin. Microbiol.*, **32**:642-648, 1994.
- 16) Lew J.F., Petric M., Kapikian A.Z., et al.: Identification of Minireovirus as a Norwalk-like virus in patients with gastroenteritis. *J. Virol.*, **68**, 3391-3396, 1994.
- 17) Jiang X., Wang J., Graham D.Y., et al.: Detection of Norwalk virus in stool by polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.*, **30**, 2529-2534, 1992.
- 18) 東京都福祉保健局：平成21年東京都の食中毒概要, 2008.
- 19) Kojima S., Kageyama T., Fukushi S., et al.: Genogroup-specific PCR primers for detection of Norwalk-like viruses. *J. Virol. Methods*, **100**, 107-114, 2002.
- 20) Kageyama T., Kojima S., Shinohara M., et al.: Broadly reactive and highly sensitive assay for Norwalk-like viruses based on real-time quantitative reverse transcription-PCR. *J. Clin. Microbiol.*, **41**, 1548-1557, 2003.

- 21) Honma S., Nakata S., Kinoshita-Numata K., et al.:Evaluation of nine sets of PCR primers in the RNA dependent RNA polymerase region for detection and differentiation of members of the family *Caliciviridae*, Norwalk virus and Sapporo virus. *Microbiol.Immunol.*, **44**, 411-419,2000.
- 22) 厚生労働省健康局, 健発 0222002 号, 2007.
- 23) 片山和彦: ノロウイルスの遺伝子型, 病原微生物検出情報,**32**,365-366,2011.
- 24) 林志直: ノロウイルス食中毒の最近動向, 日本食品微生物学会雑誌,**27**,109-114,2010.
- 25) Kageyama T., Shinohara M., Uchida K., et al.: Coexistence of multiple genotypes, including newly identified genotypes, in outbreaks of gastroenteritis due to norovirus in Japan. *J. Clin. Microbiol.*, **42**, 2988-2995, 2004.
- 26) Ando T., Monroe S., Gentsch R., et al. : Detection and differentiation of antigenically distinct small round-structured viruses(Norwalk-like viruses) by reverse transcription-PCR and southern hybridization.*J.Clin. Microbiol.*, **33**, 64-71, 1995.
- 27) Green S.M., Dingle K.E., Lamden P.R.,*et al.* :Human enteric Caliciviridae : a new prevalent small round-structured virus group defined by RNA-dependent RNA polymerase and capsid diversity. *J.Gen.Virol.*,**75**,1883-1888,1994.
- 28) Wall R.,Dymond N.,Bell A.,et al. : Two New Zealand outbreak of norovirus gastroenteritis linked to commercially farmed oyster. *N Z Med. J.* **124**,63-71,2011.
- 29) Simmons G, Garbutt C, Hewitt J. et al. : A New Zealand outbreak of

norovirus gastroenteritis linked to the consumption of imported raw Korean oyster. *N Z Med. J.* **120**,63-71,2007.

- 30) Nguyen L.M., Middaugh J.P.: Suspected transmission of norovirus in eight long-term care facilities attributed to staff working at multiple institutions. *Epidemiol. Infect.*, **8**,1-8,2011.
- 31) Marks P.J. et al. : Evidence for airborne transmission of Norwalk-like virus(NLV) in a hotel restarant. *Epidemiol. Infect.*, **124**,81-487, 2000.
- 32) Vinje J., Koopmans M.P.G. : Molecular detection and epidemiology of small round-structured viruses in outbreaks of gastroenteritis in the Netherlands. *J. Infect. Dis.*, **174**, 610-615,1996.
- 33) Gustavsson L., Andersson L.M., Lindh M., et al. : Excess mortality following community-onset norovirus enteritis in the elderly. *J. Hosp. Infect.*,**79**,27-31,2011.
- 34) Carpentier M., Ollivro J., Baron R., et al. : Investigation and control of a nosocomial norovirus outbreak in a long-term care facility. *Infect. Control Hosp. Epidemiol*, **32**, 1052-1055, 2011.
- 35) Fankhauser R.L., Monroe S.S., Noel J.S., et al. : Epidemiologic and molecular trends of “Norwalk-like viruses” associated with outbreaks of gastroenteritis in the United States. *J. Infect. Dis.*, **186**, 1-7, 2002.
- 36) Desai R., Yen C., Wilkswo M., et al. : Transmission of Norovirus among NBA players and staff, winter 2010-2011. *Clin. Infect. Dis.*, **53**,1115-1117, 2011.
- 37) Marks P.J., Vipond I.B., Regan F.M., et al. : A school outbreak of Norwalk-like virus:evidence for airborne transmission. *Epidemiol. Infect.* **131**,727-736,2003.

- 38) Chadwick P.R., McCann, R.: Transmission of a small round structured virus by vomiting during a hospital outbreak of gastroenteritis. *J. Hosp. Infect.*,**26**,251-259,1994.
- 39) Kimura, H.,Nagano, K., Kimura, N., et al.: A norovirus outbreak associated with environmental contamination at a hotel. *Epidemiol.Infect.* **139**,317-325,2011.
- 40) Oka T, Katayama K, Hansmann G.S., et al. : Detection of human sapovirus by real-time reverse transcription-polymerase chain reaction, *J. Med. Virol.*,**78**,1347-1353,2006.
- 41) 東京都健康安全研究センター：ノロウイルス対策緊急タスクフォース中間報告． 2009．
- 42) 杉枝正明，新川奈緒美，大瀬戸光明，他：Norovirus感染により排泄されるウイルス量について．臨床とウイルス， **32**,189-194,2004.
- 43) 森功次，林志直，佐々木由紀子，他：発症者および非発症者糞便中に排出される *Norovirus* 遺伝子量の比較．感染症誌， **79**,521-526, 2005.
- 44) CDC:Updated norovirus outbreak management and disease prevention guidelines. *MMWR Recommendations and Reports*,**60**.2011.
- 45) 東京都福祉保健局：平成18年東京都の食中毒概要． 2008.
- 46) Sukhrie F.H.,Siebenga J. J.,Beersma M. F. et al.: Chronic shedders as reservoir for nosocomial transmission of norovirus. *J. Clin. Microbiol.* , **48**,4303-4305,2008.
- 47) Furuya D., Kuribayashi K., Hosono Y., et al.: Age,viral copy number, and immunosuppressive therapy affect the duration of Norovirus RNA excretion in inpatients diagnosed with Norovirus infection.*Jpn. J. Infect.*

Dis.,**64**, 104-108,2011.

- 48) 東京都健康安全研究センター：ノロウイルス対策緊急タスクフォース最終報告.2010.

謝 辞

本研究の実施において御指導いただいた元東京都健康安全研究センター微生物部長 諸角聖先生，微生物部長 甲斐明美先生，研究の進行及び総括においてご指導いただいた女子栄養大学衛生学教室 桑原祥浩教授，上田成子教授に深謝いたします。