

東京都で発生した食中毒疑い事例における拭き取り検査のノロウイルス検出状況

(2010年11月～2015年3月)

木本 佳那^a, 宗村 佳子^a, 永野 美由紀^a, 小田 真悠子^a, 奥津 雄太^a,
森 功次^b, 林 志直^a, 秋場 哲哉^c, 新開 敬行^a, 貞升 健志^d

東京都では2010年11月から、ノロウイルス (NoV) 食中毒疑い事例発生時に施設中の NoV 汚染を検出するための拭き取り検査を行政検査として実施している。過去5シーズンの NoV 食中毒疑い事例発生時における拭き取り検査の有用性について検証した結果、リアルタイム PCR 法により検査を行った拭き取り検体 1,700 件のうち、陽性は 103 件 (6.1%) であった。検出率が高かった拭き取り箇所はトイレおよびその周辺であり (79 検体, 76.7%), それ以外の箇所では、厨房やカーペット等、疫学情報により NoV 汚染が疑われた箇所から NoV が検出された。食品検体を対象とした NoV 検査は 3,343 検体のうち陽性は 61 件 (1.8%) であり、拭き取り検査での陽性率の方が高率であった。また、臨床検体と拭き取り検体の遺伝子型が合致した事例は 36 件であった。以上のことから、NoV 食中毒疑い事例発生時において、拭き取り箇所の選定や適切な疫学情報とのすり合わせにより、拭き取り検査の結果が原因施設や感染経路を特定するための有用な判断材料となることが示唆された。

キーワード: ノロウイルス, 食中毒疑い事例, 拭き取り検査

はじめに

ノロウイルス (NoV) はカリシウイルス科に属する一本鎖 RNA ウイルスであり、ヒトに感染する NoV は主に遺伝子群 I, II の 2 群である¹⁾。NoV は冬季を中心に嘔吐, 下痢症を引き起こし、感染力が強く、しばしば大規模な食中毒事例の原因となる¹⁾。NoV 食中毒事例においては、患者又は不顕性感染者により施設内が NoV に汚染され、二次的に汚染が拡大することがある^{2,3)}。食品の検査と同様に、NoV の施設内汚染の検出は、感染経路を特定する有用な判断材料とされている³⁾。

東京都では、拭き取り検体を対象とした NoV 検査 (以下、拭き取り検査) について手技の検討を行い、2010 年 11 月から拭き取り検査を行政検査として実施している。また、2016 年 11 月には NoV 食中毒疑い事例に対する拭き取り検査実施に言及した通知が厚生労働省より示され、汚染経路調査のため施設の便器内の拭き取り実施の必要性について明記された⁴⁾。しかし、拭き取り検査の有用性についての知見は乏しいのが現状である。そこで、2010 年 11 月から 2015 年 3 月までの 5 シーズンにおける拭き取り検査からの NoV 検出状況を総括し、臨床検体及び食品検体からの NoV 検出状況との比較も併せて、NoV 食中毒疑い事例発生時における拭き取り検査の有用性について検証したので報告する。

材料と方法

1. 供試材料

2010 年 11 月から 2015 年 3 月の間に、食中毒疑い事例発生に伴い東京都健康安全研究センターに搬入された拭き取り検体 1,700 件を対象とした。同期中に検査を実施した食品検体は 3,343 件であった。また、患者又は従事者由来の臨床検体について、検出遺伝子群・遺伝子型の比較の対象とした。

2. 拭き取り試料

拭き取りには、ふきとりエース L (栄研化学) 等の 10~20 mL の滅菌リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) が入った拭き取り容器を使用し、うち約 8 mL を検査に供した。拭き取り箇所の選定及び拭き取り作業は、食中毒疑い関連施設調査の際に、都内の各保健所職員が実施した。

3. 検体の前処理

拭き取り液約 8 mL に対して、超遠心 (186,800 ×g, 2 時間) 処理を行った後、沈渣を PBS 又は 0.5% Zwittergent 加 PBS280 μL で再浮遊し、そのうち 140 μL を RNA 抽出に用いた⁵⁾。食品検体に対しては、既報の通りの処理を行った⁵⁾。臨床検体に対しては、PBS を用いて 10% 乳剤を作製し、15,100 ×g, 20 分間遠心を行い、上清を RNA 抽出に用いた。

^a 東京都健康安全研究センター微生物部ウイルス研究科
169-0073 東京都新宿区百人町 3-24-1

^b 東京都健康安全研究センター微生物部食品微生物研究科

^c 東京都健康安全研究センター企画調整部健康危機管理情報課

^d 東京都健康安全研究センター微生物部

4. NoV 遺伝子検出

RNA 抽出からリアルタイム PCR 法による NoV 検出までの操作は、厚生労働省通知（平成 19 年 5 月 14 日食安監発第 0514004 号）に準拠して行った⁶⁾。すなわち、QIAamp Viral RNA Mini キット (QIAGEN) を用いて RNA 抽出物を得た。その後、逆転写酵素 SuperScriptII (invitrogen) を用いて 42°C 60 分の逆転写反応を行い、99°C 5 分間、酵素の失活を行った。得られた cDNA を用いて UniversalMasterMix (Applied Biosystems) により、50°C 2 分、95°C 10 分の熱処理後、95°C 15 秒、56°C 1 分の反応を 45 回行うリアルタイム PCR 法を行った (2010 年 11 月～2012 年 6 月)。又は、RNA を用いて Quantitect Probe RT-PCR Kit (QIAGEN) により、50°C 40 分の逆転写反応を行い、95°C 15 分で酵素の失活を行った後に、94°C 15 秒、56°C 75 秒を 45 回行うリアルタイム RT-PCR 法に供した (2012 年 7 月～2015 年 3 月)。リアルタイム PCR 法及び RT-リアルタイム PCR 法には ABIPRISM7900 (Applied Biosystems) を用い、NoV 遺伝子群 I (GI) 検出用のプライマーおよびプローブとして COG1F/COG1R (100 pmol/μL), RING1-TP (a) (30 pmol/μL), 遺伝子群 II (GII) 用として COG2F/COG2R (100 pmol/μL), RING2-TP (10 pmol/μL) をそれぞれ用いた。10 コピー以上となった検体を陽性と判定し、10 コピー前後であった一部の検体に対しては、既報の 2nd リアルタイム PCR を確認検査として実施した⁷⁾。また、検出状況に応じてサポウイルス及び A 群ロタウイルスの検査を行った^{8,9)}。

5. NoV 遺伝子解析

拭き取り陽性検体の一部及び臨床検体に対しては、厚生労働省通知（平成 19 年 5 月 14 日食安監発第 0514004 号）に準拠し N/S 領域における NoV 遺伝子解析を行った⁶⁾。すなわち、上述と同様の操作により得られた cDNA 5 μL

を鋳型とし、ExTaq (TaKaRa) を用いて、94°C 3 分の後、94°C 1 分、50°C 1 分、72°C 2 分を 40 回繰り返し、72°C 15 分の最終伸長反応を行う 1st PCR 反応に供した。1st PCR で遺伝子の増幅が認められなかった場合は、同様の増幅条件の 2nd PCR を実施した (サイクル数は 35 回)。プライマーは GI 用に COG1F (2nd PCR は G1SKF) /G1SKR, GII 用には COG2F (2nd PCR は G2SKF) /G2SKR を用いた。得られた PCR 産物を Nucleo Spin Extract II (MACHEREY-NAGEL) 又は Amicon Ultra (Merck) を用いて精製し、Big Dye Terminator v1.1 Cycle Sequence 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 PRISM™ 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) により塩基配列分析を行った。遺伝子解析は GENETYX version 10 を用いて行い、遺伝子型の分類は、Norovirus Genotyping Tool v1.1 (<http://www.rivm.nl/mpf/norovirus/typingtool>) により決定した。

結 果

検査に供した拭き取り検体 1,700 件 (315 事例) のうち、陽性検体は 103 件 (61 事例)、陽性率は 6.1% (事例別では 19.4%) であった。さらに患者より NoV が検出された事例に限ると、1,296 件 (226 事例) のうち 100 件 (58 事例)、陽性率は 7.7% (事例別では 25.7%) であった。患者より NoV が検出されなかったが拭き取り検査陽性となった事例は 3 件認められたが、うち 2 件は患者の調査が行えなかった事例、1 件は患者 13 名のうち検査が実施できたのは 1 検体のみという事例であった (Table 1)。

Table 1. Results of NoV Detection from Swab or Food Samples

	NoV-positive Samples or Outbreaks / Tested Samples or Outbreaks (Positive Rate)					
	Total Case		NoV-detected from Patients Case		NoV-undetected from Patients Case	
	Samples	Outbreaks	Samples	Outbreaks	Samples	Outbreaks
Swab Samples	103/1,700(6.1%)	61/315(19.4%)	100/1,296(7.7%)	58/226(25.7%)	3/89(0.3%)	3/404(0.7%)
Food Samples	61/3,343(1.8%)	50/689(7.3%)	55/2,061(2.7%)	45/381(11.8%)	5/308(1.6%)	6/1,282(0.5%)

Table 2. Sampling Areas of Lavatory Detected NoV

Users of Lavatory	Lavatory Seats			Flushing Levers, Taps			Doorknobs			Walls, Floors			Total
	Emplo- yees	Custo- mers	Indistnct	Employees	Custo- mers	Indistnct	Employees	Custo- mers	Indistnct	Employees	Customers	Indistnct	
Total	13	6	40	6	0	3	2	0	2	3	0	4	79

トイレおよびその周辺の拭き取り検体で陽性となった検体 (79 件) には, 従事者専用トイレや, 手洗い器やドアノブ等の手指が触れる部分も含まれていた (Table 2). その他, 施設内の拭き取り検体で陽性となった検体 (24 件) には, 厨房やカーペット等共有スペースの拭き取り検体から NoV が検出されたものがあり (Table 3), これらは嘔吐歴等の疫学情報より NoV 汚染が疑われた箇所であった。

臨床検体より NoV が検出された事例においては, いずれも臨床検体と拭き取り検体から検出された NoV 遺伝子群が一致していた。患者及び従事者の検体と拭き取り検体の NoV 遺伝子型が一致していた事例は 22 件, 従事者の検体の遺伝子型は判明しなかったが, 患者の検体と拭き取り検体の NoV 遺伝子型が一致していた事例は 14 件認められた (Table 4)。Table 4 に示した事例のうち, 事例 9~11, 17, 20, 22, 31~33, 35 においては臨床検体と従事者専用トイレからの遺伝子型が一致, 事例 22, 28~30, 33 においては臨床検体と患者の利用したトイレからの遺伝子型が一致した。

患者からサポウイルスが検出された集団事例においては, トイレの拭き取り検体 1 件からサポウイルスが検出され, 患者から A 群ロタウイルスが検出された集団事例においては, トイレの拭き取り検体 3 件及びバギー (ベビーカー) の拭き取り検体 1 件から A 群ロタウイルスが検出された (Table 4)。

食品検体を対象とした NoV 検査においては, 検査を行った 3,343 検体 (689 事例) のうち陽性検体は 61 検体 (50 事例) であり, 陽性率は 1.8% (事例別では 7.3%) であった。さらに NoV 検出事例に限ると, 2,061 件 (381 事例) のうち 55 件 (45 事例), 陽性率は 2.7% (事例別では 11.8%) であった (Table 1)。

Table 3. Sampling Areas except Lavatory Detected NoV

Swabbed Areas / Genotype of the Outbreak
Case 1. Carpets(2 samples), a wall/ GII.3
Case 2. Vacuums(2 samples), a wall/ GII.3
Case 3. A diaper changing table/ GII.3
Case 4. Ventilation opening(5 samples), suction opening of an air conditioner, doormats(2 samples)/ GII.2
Case 5. Wall of a kitchen, seepage water of a wall*/ GII.4
Case 6. A kitchen table of oysters/ GII.4
Case 7. Inner surface of a sink(4 samples), a handle of a refrigerator, a hand wash basin/ GII.4

*GI and GII were determined from this sample.

考 察

東京都で NoV の検出を目的とした拭き取り検査を行政検査として開始してから 5 シーズンが経過し, 拭き取り検査の有用性の検証のため NoV 検出状況について検討した。NoV 食中毒疑い事例発生時に行う調査の一環として, 食品の NoV 検査に加え, 施設の拭き取り検査は原因施設及び感染経路を特定するための手段として有用であるとの報告がある^{10,11)}。

今回の結果においても, 臨床検体と拭き取り検体の遺伝子型の一致が認められたことにより, 感染経路の推定が可能となった事例が認められた。すなわち, 臨床検体の検査結果と従事者専用トイレの拭き取り検査結果を併せることで従事者を介した食中毒事例の疑いが示唆された事例や, 患者の利用したトイレの拭き取り検査結果より施設利用者による NoV の持ち込みの疑いが示唆された事例が認められた。従って, NoV の拭き取り検査は, 臨床検体の検査結果及び疫学情報と併せることで, 感染経路の推定に利用することが可能である。

NoV が検出されたトイレの拭き取り部位は便器が最多であったが, 手洗い器やドアノブ等の手指が触れる部分からも検出された。また, 嘔吐歴等の疫学情報より NoV 汚染が疑われた箇所から NoV が検出された例も認められた。従って, 拭き取り検査実施の際には, トイレにおいては便器を中心に行い, 併せて利用状況の調査・把握をし, その他の施設内の拭き取り検査については, 嘔吐歴等の NoV 汚染が強く疑われる疫学情報を収集することが重要である。

NoV 食中毒疑い事例発生時の原因究明においては, 原因食品から NoV が検出されることが望ましいが, 食品成分が NoV 検出を阻害し検出が困難な状況がある¹²⁾。また, 検査や残品が得られず, 参考品のみの検査に限られる場合がある。今回, 食品からの NoV 検出率と比較して拭き取り検査の検出率が高率であり, 臨床検体と拭き取り検体の遺伝子型が一致していた事例が多数認められた。さらに, ISO のプロトコール¹³⁾に拭き取り検査法が示されている背景と併せ, 拭き取り検査の実施に言及した通知が示されたことから⁴⁾, 拭き取り検査の有用性は高いといえる。

なお, サポウイルス及び A 群ロタウイルスについては拭き取り検査における知見は乏しいが, これらについても NoV と同様に検査を行うことが可能と考えられる。

拭き取り検査における NoV 回収率は, 4.1~77.3%であり⁵⁾, NoV 汚染が微量であれば検出できない場合も推定される。拭き取り箇所の素材による回収率の差も示唆されており⁴⁾, 今後さらなる検討が必要である。

Table 4. Genotypes of NoV and the Other Viruses from Tested Samples
in 38 Community Gastroenteritis Outbreaks Suspected to be Foodborne

Case No.	Patients	Emplo- yees	Swab Samples										
			Lavatory Seats			Flushing Levers, Taps		Doorknobs		Walls, Floors		Common Areas	Kitchens
			Indistinct	Employees	Patients	Indistinct	Employees	Indistinct	Employees	Indistinct	Employees		
1~4	GII.4	GII.4	GII.4										
5	GII.5	GII.5	GII.5										
6	GII.6	GII.6	GII.6										
7	GII.12	GII.12	GII.12										
8	GII.13	GII.13	GII.13										
9	GI.2	GI.2		GI.2									
10	GII.2	GII.2		GII.2									
11	GII.4	GII.4		GII.4									
12	GII.2	GII.2	GII.2									GII.2	
13,14	GII.4	GII.4	GII.4										GII.4
15,16	GII.3	GII.3										GII.3	
17	GII.4	GII.4		GII.4			GII.4		GII.4		GII.4		
18	GII.4	GII.4						GII.4					
19	GII.4	GII.4											GII.4
20	GII.4	GII.4	GII.4				GII.4		GII.4				
21	GII.17	GII.17								GII.17			
22	GII.4	GII.4		GII.4	GII.4								
23~25	GII.4		GII.4										
26	GII.5		GII.5										
27	GII.17		GII.17										
28~30	GII.4				GII.4								
31,32	GII.4			GII.4									
33	GII.4			GII.4	GII.4								
34	GII.4					GII.4							
35	GII.4								GII.4				
36	GII.3											GII.3	
37	Sapo- virus	Sapo- virus	Sapo- virus										
38	Group A Rota- virus		Group A Rota- virus	Group A Rota- virus								Group A Rota- virus	

ま と め

食中毒疑い事例発生時に行う調査の一環として、食品のNoV検査結果に加えて、施設の拭き取り検査によるNoV検出は原因施設及び感染経路を特定するための手段として有用であると考えられた。ただし、有効な判定を行うために、推定される感染経路を考慮し、疫学情報と併せて拭き取り箇所の選定を的確に行う必要がある。

謝 辞 本調査にあたりご協力いただいた東京都福祉保健局食品監視課食中毒調査担当に感謝申し上げます。

文 献

- 1) 牛島廣治, 沖津祥子, Khamrin PATTARA : ウイルス, **61**, 193-204, 2011.
- 2) 吉田徹也, 中沢春幸 : 感染症誌, **84**, 702-707, 2010.
- 3) Park G.W, Lee D, Treffiletti A., *et al.*: *Appl Environ Microbiol*, **81**, 5987-5992, 2015.
- 4) 厚生労働省医薬・生活衛生局生活衛生・食品安全部監視安全課長 : 生食監発 1124 第 1 号, ノロウイルスによる食中毒の予防及び調査について (通知), 平成 28 年 11 月 24 日.
- 5) 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.
- 6) 厚生労働省医薬食品局食品安全部監視安全課長 : 食安監発第 0514004 号, ノロウイルスの検出法について (通知), 平成 19 年 5 月 14 日.
- 7) 永野美由紀, 秋場哲哉, 森 功次, 他 : 東京健安研七 年報, **65**, 47-51, 2014.
- 8) Oka T, Katayama K, Hansman G.S., *et al.*: *J Med Virol*, **78**, 1347-1353, 2006.
- 9) Jothikumar N, Kang G, Hill V.R., *et al.*: *J Virol Methods*, **155**, 126-131, 2009.
- 10) Boxman IL, Dijkman R, te Loeke N.A., *et al.*: *J Food Prot*, **72**, 111-119, 2009.
- 11) 宗村佳子, 木本佳那, 小田真悠子, 他 : 食衛誌, **58**, 201-204, 2017.
- 12) 秋場哲哉, 田中達也, 新井輝義, 他 : 食衛誌, **49**, 407-410, 2008.
- 13) Anonymous: ISO/TS 15216-1, 9, 2013.

**Detection of Norovirus from Swabs Collected from Community Gastroenteritis Outbreaks
Suspected to be Foodborne in Tokyo (November 2010-March 2015)**

Kana KIMOTO^a, Yoshiko SOMURA^a, Miyuki NAGANO^a, Mayuko ODA^a, Yuta OKUTSU^a,
Kohji MORI^a, Yukinao HAYASHI^a, Tetsuya AKIBA^a, Takayuki SHINKAI^a and Kenji SADAMASU^a

Here, we used swabs on inanimate surfaces as environmental sampling tools to detect Norovirus (NoV) in case of community gastroenteritis outbreaks that are suspected to be foodborne (starting November 2010-). To evaluate the potential utility of swab samples for community gastroenteritis outbreaks, we summarize results of NoV detection from swab samples collected from November 2010 to March 2015. Using real-time PCR, we found that 103 of the tested 1,700 samples (6.1%) were positive for NoV. Seventy-nine of the 103 positive samples (76.7%) were swabbed from or around a lavatory. Positive samples from other areas (e.g., kitchens, carpets) were the areas suspected to be contaminated by NoV. However, for food samples, only 61 of the 3,343 tested samples (1.8%) were positive. Thus, the positive rate of NoV detected in swab samples was much higher than that in food samples. In 36 cases, stool or vomit samples had matching genotypes with those detected in the swab samples. In conclusion, our data suggest that testing swab samples is useful for investigating outbreaks of viral gastroenteritis with approval epidemiology information.

Keywords: Norovirus, the community gastroenteritis outbreaks suspected to be foodborne, swabs as environmental sampling tools

^a Tokyo Metropolitan Institute of Public Health,
3-24-1, Hyakunin-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 169-0073, Japan