=原 著=

東京都内における非発症調理従事者の ノロウイルス排泄期間

林 志直[†]・秋場 哲哉・森 功次
永野美由紀・甲 斐明美

(東京都健康安全研究センター)

(受付: 平成23年8月21日)

(受理: 平成24年3月13日)

Duration of *Norovirus* RNA Excretion in Asymptomatic Food-Handlers in Tokyo

Yukinao HAYASHI[†], Tetsuya AKIBA, Kohji MORI,
Miyuki NAGANO and Akemi KAI

(Tokyo Metropolitan Institute of Public Health, 3-24-1 Hyakunin-cho,
Shinjuku-ku, Tokyo 169-0073; [†] Corresponding author)

Norovirus (NoV) is one of the most important causative agent of food-borne gastroenteritis outbreaks. Studies of NoV outbreaks associated with food-handlers who were infected with NoV have been frequently reported. However, precise reports on the duration of NoV shedding from food-handlers are not found. In this report, we examined 94 stool specimens from 28 food-handlers in 10 food-borne outbreaks for the duration of NoV RNA excretion during the period from April 2009 to March 2010. The median duration of viral shedding was 21.9 days after causative foods were prepared. 17 food-handlers out of 28 (61%) excreted NoV RNA in the stool until 18 days after causative foods were prepared. However, five food-handlers out of 28 (18%) excreted NoV RNA more than one month. When more than ten days have passed after causative foods were prepared, the quantity of NoV excreted in feces from all 5 food-handlers decreased in the range of 1.7×10^4 to 9.6×10^6 /g, and became negative after the excretion continued in the same range for three to five weeks. We should monitor carefully food-handlers who excreted NoV RNA to prevent the spread of food poisoning associated with NoV.

Key words: *Norovirus*, food-borne gastroenteritis, real-time PCR, food-handler, viral shedding

緒 言

急性胃腸炎症状を呈するウイルス性食中毒は冬季を中心に発生し、主な病原ウイルスはノロウイルス (*Norovirus*, 以下NoVと略), サポウイルス (*Sapovirus*), ロタウイルス (*Rotavirus*), アストロウイルス (*Astrovirus*), アデノウイルス (*Adenovirus*) などである⁸⁾。なかでもNoVはウイルス性食中毒の最も重要な病因ウイルスで

あり、乳幼児から高齢者まで幅広い年齢層に感染し、嘔吐・下痢・腹痛・発熱などの症状を引き起こす。東京都において2001年から2010年までの10年間に発生した食中毒の病因物質別の事例数^{10,11)} (平成22年東京都食中毒発生状況(確定値): http://www.fukushihoken.metro.tokyo.jp/shokuhin/tyuudoku/h22_kakutei.html) では、2008年を除いて毎年NoVに起因する事例が最も多かった。NoV食中毒は、主としてNoVが蓄積したカキなどの二枚貝を生食または加熱不十分で喫食、あるいはNoVに感染した調理従事者により汚染された食品を喫

[†] 連絡先

〒169-0073 東京都新宿区百人町3-24-1

食することにより発生すると考えられている²⁾。特に近年は、調理従事者の食品汚染が原因と推定される食中毒事例が非常に多い^{3,7)}。

NoVが糞便から検出された調理従事者は、食中毒防止対策を進めるうえで陰性確認が必要であるが、非発症者におけるNoV排泄期間などに関する報告は少ない。本論文では2009年4月から2010年3月の1年間に東京都内で発生した食中毒事例のウイルス検索において、NoV陽性となった調理従事者について経時的に糞便を検査し、陰性確認を行った結果、NoVの長期排泄者の存在が明らかとなったので報告する。

材料と方法

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事例に関連した非発症調理従事者28名からの糞便94件を対象にした。

2. 検査方法

1) 検査材料の前処理

検査材料(糞便)はPBS(－)(pH 7.4; 日水製薬)により10%乳剤を調整し、3,000 rpm、10分遠心分離(HIT-ACHI himac CF8DL)を行った。その上清を分取し、核酸抽出材料とした。

2) 核酸抽出

核酸の抽出は、核酸抽出材料140 μ lから厚生労働省通知法⁵⁾に示されたQIAamp Viral RNA Mini Kit (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60 μ lを得た。

3) cDNA合成

逆転写反応は、5×First Strand Buffer (Invitrogen) 6 μ l, 2.5 mM dNTPs (TaKaRa) 1.5 μ l, 1 μ g/ μ l Random hexamer (Amersham Biosciences) 0.75 μ l, 100 mM Di-thiothreitol (Invitrogen) 1.5 μ l, 40 U/ μ l RNase inhibitor (ナカライテスク) 1 μ l, 200 U/ μ l Super Script II RNaseH[−] 逆転写酵素 (Invitrogen) 1.5 μ l, および蒸留水 5.75 μ lと核酸抽出液12 μ lを混合し、42℃、60分の反応により行い、cDNAを作製した。

4) ノロウイルス遺伝子の検出

NoV遺伝子の検出は、厚生労働省通知法⁵⁾に基づいたリアルタイムPCR法により実施した。すなわち、cDNA 5 μ lと2×TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems) 12.5 μ l, プライマー各 0.2 μ l, プロンプ0.3 μ l, および蒸留水6.8 μ l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ンプは、NoV遺伝子群I (以下GIと略) 検出用にはCOG1F/COG1R (100 pmol/ μ l), RING1-TP (a) (30 pmol/ μ l), NoV遺伝子群II (以下GIIと略) 検出用にはCOG2F/COG2R (100 pmol/ μ l), RING2-TP (10 pmol/ μ l)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、10⁷から10⁰コピーまで10倍段階希釈系列を作成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。

5) ノロウイルスの遺伝子解析

前述の方法により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NoVGIIの解析にはCOG2F/G2SKRの領域を対象としたRT-PCR法⁴⁾を行い、PCR産物をMontage-PCR (Millipore)を用いて精製し、BigDye 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-SepTM 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⁴⁾から遺伝子型を判定した。

結 果

1. 調査対象とした食中毒事例の概要

調査期間中にNoVに起因する食中毒が67事例発生し、38事例において調理従事者からNoVが検出され、このうち調査が可能であった10事例の非発症調理従事者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が4事例、仕出弁当やケータリングなどの食品販売を行う施設が2事例であった。事例から検出された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(Table 1)。

2. 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陰性確認試験成績を示した(Table 2)。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検査が行われ、調理従事者の糞便から10⁴~10⁹コピー/g糞便のNoV遺伝子が検出された。なお、この検査法の検出限界は2.1×10⁴コピー/g糞便であった。

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日後で調査対象とした調理従事者全員のNoV陰性が確認された。なお、調理従事者は発症していないため、発症後の日数ではなく、原因食品を提供した日を基準とした経過日数で示した。28名中14名(50%)では、1回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。

NoV陰性確認までに要した日数の度数分布をFig. 1に示した。18日目までに陰性となった調理従事者は28名中17名(61%)であったが、陰性確認に4週間以上を要した調理従事者も5名(18%)認められた。

Table 1. *Norovirus*-associated outbreaks studied

No.	Date	No. of		Type of settings	No. of food-handlers tested	Genotype of NV associated
		Persons at risk	Patients			
1	2009. 5	182	57	Funeral service	5	GII/4
2	12	7	6	Funeral service	6	GII/2, GII/13
3	12	Unknown	17	Restaurant	1	GII/4
4	12	11	8	Funeral service	1	GII/4
5	2010. 1	45	29	Fast food	2	GII/4
6	1	22	12	Fast food	1	GII/2
7	1	36	32	Restaurant	6	GII/7
8	1	21	6	Restaurant	1	GII/4
9	1	62	25	Wedding party	2	GII/4
10	1	105	11	Restaurant	3	GII/4

Table 2. Detection of *Norovirus* RNA in stools of food-handlers

No. of outbreak-food-handler	Genotype of NV detected	No. of copies	NV negative confirmation test: No. of copies					
		Original examination	1st	2nd	3rd	4th	5th	10th
1-1	GII/4	3.3×10^6 (5)*	ND (11)					
1-2		8.1×10^7 (5)	ND (11)					
1-3		1.0×10^9 (5)	1.4×10^7 (11)	5.9×10^5 (18)	ND (26)			
1-4		3.2×10^8 (5)	4.2×10^5 (11)	8.0×10^4 (18)	2.1×10^5 (26)	6.4×10^4 (33)	ND (47)	
1-5		7.9×10^8 (7)	2.1×10^4 (11)	1.4×10^5 (18)	2.1×10^4 (26)	ND (33)		
2-1	GII/2	8.2×10^6 (4)	9.7×10^4 (10)	3.4×10^5 (13)	ND (17)			
2-2		1.1×10^6 (5)	7.0×10^4 (10)	4.6×10^4 (13)	ND (17)			
2-3		3.8×10^7 (5)	6.9×10^4 (10)	2.8×10^4 (13)	4.0×10^4 (16)	7.5×10^4 (17)	ND (21)	
2-4	GII/13	4.3×10^8 (5)	6.4×10^4 (10)	4.5×10^4 (13)	ND (17)			
2-5		3.5×10^8 (5)	ND (16)					
2-6		9.3×10^7 (7)	ND (21)					
3-1	GII/4	1.0×10^5 (8)	ND (17)					
4-1	GII/4	2.1×10^4 (8)	ND (17)					
5-1	GII/4	1.2×10^7 (4)	ND (14)					
5-2		6.6×10^7 (4)	ND (14)					
6-1	GII/2	1.1×10^7 (6)	4.2×10^5 (12)	ND (26)				
7-1	GII/7	3.9×10^4 (4)	3.9×10^4 (13)	ND (24)				
7-2		1.8×10^5 (6)	ND (16)					
7-3		7.8×10^5 (6)	3.4×10^5 (16)	1.1×10^6 (27)	ND (48)			
7-4		4.6×10^4 (8)	ND (18)					
7-5		1.5×10^5 (8)	ND (16)					
7-6		2.6×10^5 (8)	ND (13)					
8-1	GII/4	9.0×10^4 (4)	ND (16)					
9-1	GII/4	1.1×10^7 (4)	9.6×10^5 (12)	1.6×10^5 (17)	1.1×10^4 (24)	ND (34)		
9-2		1.6×10^5 (5)	ND (12)					
10-1	GII/4	6.0×10^4 (6)	6.0×10^4 (11)	ND (17)				
10-2		2.0×10^7 (7)	1.8×10^5 (12)	2.8×10^4 (18)	ND (21)			
10-3**		2.0×10^8 (6)	5.6×10^4 (11)	3.5×10^4 (17)	3.7×10^4 (20)	2.4×10^4 (25)	8.4×10^4 (28)	ND (53)

* Numbers in the parenthesis are the days after causative foods were prepared, ND: not detected

** 6th : 2.8×10^4 (33), 7th : 4.5×10^4 (39), 8th: 2.5×10^4 (42), 9th: 3.0×10^4 (47)

3. 陰性確認試験におけるNoV遺伝子コピー数の推移

NoV陰性が確認されるまでに要した日数によって3週間以内17名 (Fig. 2A), 3週間から4週間以内6名 (Fig. 2B), 4週間以上5名 (Fig. 3)に分け, 非発症調理従事者

の糞便中に排出されるNoV遺伝子コピー数の推移を示した. 3週間以内にNoV陰性確認された調理従事者17名のうち, 15名の糞便に排出されるNoV遺伝子コピー数は日数の経過とともに減少した (Fig. 2A). しかし, 陰性確認に3週間から4週間以内を要した群では, 6例

Fig. 1. Distribution of the days *Norovirus* eliminated in asymptomatic food-handlers

Fig. 2. Duration of *Norovirus* RNA shedding in food-handlers

Fig. 3. Kinetics of *Norovirus* RNA shedding longer than 30 days

中2例(従業員2-1と10-1)でNoV遺伝子コピー数が $10^4 \sim 10^5$ /g 糞便の状態が1週間程度認められた後に陰性化した(Fig. 2B). 陰性確認に4週間以上を要した群では、最初のNoV検出において 7.8×10^6 から 7.9×10^8 コピー/g 糞便の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 $1.7 \times 10^4 \sim 9.6 \times 10^5$ /g 糞便まで減少し、NoVコピー数が $10^4 \sim 10^6$ /g 糞便の範囲で3週間から5週間継続した後に陰性化した(Fig. 3). NoV排泄が4週間以上続いた調理従事者から検出された遺伝子型は4名からGII/4, 1名からGII/7であった。

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事例の非発症者の調理従事者28名からの糞便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の健康状態は良好であった。しかし、調査対象はすべて食中毒事例であり、推定原因食の喫食日は特定されている。このため、今回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表した。

NoV陽性となった調理従事者がNoV陰性と確認されるまでに要した日数は、3週間以内17名、3週間から4週間以内6名、4週間以上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。杉枝らの報告⁹⁾では非発症の調理従事者5名について糞便から経時的にNoV検出を行い、このうち3名では初回検査から15日後にも $10^4 \sim 10^7$ コピー/g糞便のNoV遺伝子を検出している。森らの報告⁶⁾では、調理従事者から糞便に排泄される平均NoV遺伝子コピー数は 2.03×10^4 コピー/g糞便であり、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.mhlh.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、長いときは1カ月以上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発症者の成績^{6,9)}とほぼ同様であり、非発症者28名中5名(18%)において陰性確認まで1カ月以上の長期間を要した者も認められた。

CDCは2011年にノロウイルス対策ガイドライン¹⁾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。しかし、今回の調査において、NoV排泄が1カ月以上続いた調理従事者の糞便に含まれるNoV遺伝子コピー数は $10^4 \sim 10^6$ コピー/g糞便を維持し、NoV感染拡大の原因となることが判明した。NoV食中毒の再発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、陰性確認まで調理従事者の従事制限を継続すること

が必要と考える。

近年NoV食中毒から検出されるNoVの遺伝子型にも変化が認められている。ノロウイルス食中毒が多発した2006/2007流行期にはGII/4がほとんどを占めていたが、2008/2009流行期はGII/4の占める割合は50%以下に低下している¹²⁾。今回の調査においても、NoVの排出が1カ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が認められ、さまざまなNoV遺伝子型に起因する食中毒が予想される。今後、NoVの長期排泄に関しては、その要因についてウイルス側・宿主側両面から検討する必要性が示された。

要 約

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事例に関連した調理従事者28名から、経日的に糞便94件を採取し、NoV陰性確認試験を実施した。推定原因食品提供後に、NoV陰性が確認されるまでに要した日数は平均21.9日であった。調理従事者28名中17名(61%)は3週間以内に陰性となったが、5名(18%)では陰性確認に4週間以上を要した。NoV排泄が4週間以上続いた調理従事者においては、10日以上経過すると糞便中のNoV遺伝子コピー数が $1.7 \times 10^4 \sim 9.6 \times 10^5$ /g糞便まで減少し、この状態が3週間から5週間継続した後に陰性化した。NoV食中毒の再発防止のために調理に直接従事する者の陰性確認試験の重要性が示された。

文 献

- 1) CDC: Updated norovirus outbreak management and disease prevention guidelines. MMWR Recommendations and Reports, **60** (2011).
- 2) 林 志直: ノロウイルス食中毒と感染性胃腸炎. 食衛誌, **51**, 279-284 (2010).
- 3) 林 志直, 森 功次, 野口やよい, 秋場哲哉, 吉田靖子, 山田澄夫: 胃腸炎集団発生から検出されたノロウイルスの遺伝子解析. 東京健安研年報, **57**, 83-86 (2006).
- 4) Kageyama, T., Shinohara, M., Uchida, K., Fukushi, S., Hoshino, B.F., Kojima, S., Takai, R., Oka, T., Takeda, N. and Katayama, K.: Coexistence of multiple genotypes, including newly identified genotypes, in outbreaks of gastroenteritis due to *Norovirus* in Japan. J. Clin. Microbiol., **42**, 2988-2995(2004).
- 5) 厚生労働省医薬食品局食品安全部監視安全課長: ノロウイルスの検査法について. 平成19年5月14日, 食安監発第0514004号(2007).
- 6) 森 功次, 林 志直, 佐々木由紀子, 野口やよい, 甲斐明美, 諸角 聖: 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).
- 7) 永野美由紀, 林 志直, 秋場哲哉, 森 功次, 田中達也, 保坂三継, 甲斐明美: 都内における胃腸炎集団発生例のウイルス検出 (平成19-20年度). 東京健安研年報, **60**, 55-59 (2009).
- 8) 西尾 治: ウイルス感染症. 食品由来感染症と食品微生物. 仲西寿男, 丸山務監修, p. 510-514, 中央法規出版,

- 東京(2009).
- 9) 杉枝正明, 新川奈緒美, 大瀬戸光明, 徳竹由美, 山口卓, 秋山美穂, 西尾 治: *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).
- 10) 東京都福祉保健局健康安全室: 平成17年東京都の食中毒概要(2007).
- 11) 東京都福祉保健局健康安全部: 平成21年東京都の食中毒概要(2011).
- 12) 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).