調査・資料

拭き取り検体からのノロウイルス遺伝子検出状況

(平成29年4月12日受理)

宗村佳子* 木本佳那 小田真悠子 永野美由紀
奥津雄太 森 功次 秋場哲哉 貞升健志

Detection of Norovirus in Swab Specimens of Restrooms and Kitchens Collected
for Investigation of Suspected Food Poisoning Outbreaks in Tokyo

Yoshiko SOMURA*, Kana KIMOTO, Mayuko ODA, Miyuki NAGANO,
Yuta OKUTSU, Kohji MORI, Tetsuya AKIBA and Kenji SADAMASU

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

* Corresponding author

During 2015–2016, we examined norovirus (NoV) RNA in swab specimens collected for investigation of suspected food poisoning outbreaks in Tokyo by real-time RT-PCR. Of 1,726 swab samples, 65 (3.8%) were NoV-positive and all positive swab samples were derived from NoV-positive outbreaks. Swab specimens were positive in 41 of 181 (22.7%) NoV outbreaks, while no positive swabs were detected in NoV-negative outbreaks. PCR fragments amplified from 32 swabs were sequenced, and all of them displayed complete homology with sequences from clinical and food samples. Though the results of swabs may be useful for determining the causative agent and infection route in some outbreaks, there was no case in which the results of swabs alone could elucidate the cause of food poisoning. Swabs may be useful in food poisoning investigations, if the results are interpreted in conjunction with epidemiological findings and clinical data. Swab samples are often collected several days after an outbreak, and the influence of disinfection should be taken into consideration. In NoV outbreaks, 55 out of 640 (8.6%) restroom swab specimens were NoV-positive whereas six of 618 (1.0%) were positive among kitchen swab specimens. In the restroom, the toilet bowl (43.6%) showed the highest positive rate and next was the toilet seat (14.5%). Additionally, NoV was detected at various sites in the restroom, including doorknob and floor. Since NoV-positive swab specimens may suggest that sanitation management is not performed properly in the facility, swab results may be utilized as a basis for hygiene guidance.

(Received April 12, 2017)

Key words: 食中毒 food poisoning; ノロウイルス norovirus; 拭き取り swab; トイレ restroom

はじめに

厚生労働省通知^{*1}によれば、全国のノロウイルス (NoV) による食中毒患者数は全体の約6割を占め、その予防および原因の究明は食中毒対策上の重要な課題となっている。不顕性感染者も一定の割合で存在し^{1),2)}、食品従事者におけるNoVの不顕性感染率は0.53~12.6%程度とされる^{3)~6)}。食品媒介性のNoV集団発生事例において、感染した従業員の関与が考えられる事例は全体の70%あるいは48%を占めるとの報告^{7),8)}もあり、従業員の健康管

理ならびに調理場などの衛生管理は極めて重要である。前述の通知では、食中毒の原因調査においては、調理従事者の健康状態などを調査すること、さらに、調査の信頼性を確保するため、便器内部の拭き取り検査を実施することが各自治体に求められている。しかし、NoVの検出を目的とした拭き取り検査に関しては、その有用性を含め、わが国における科学的知見に乏しいのが現状である。そこで、2015年1月から2016年12月までの2年間において、東京都内で食中毒が疑われた事例に関連して、東京都健康安全研究センター (センター) に搬入された拭き取り検体からのNoV検出状況について報告する。

* 連絡先 Yoshiko_Soumura@member.metro.tokyo.jp
東京都健康安全研究センター: 〒169-0073 東京都新宿区百人町3-24-1

*1 「ノロウイルスによる食中毒の予防及び調査について」(平成28年11月24日付け生食監発1124第1号)

材料および方法

1. 材 料

2015～2016年に、食中毒が疑われ、都内保健所からセンターに検査依頼のあった259事例（事例の内訳：NoV検出事例181、NoV不検出事例78、NoV検出事例のうち、食中毒と断定されたものは107事例）の拭き取り1,726検体（調理室890、トイレ777、その他59）を対象とした（「その他」の内訳：従業員の手指19、小児施設・ホテルなどの設備品17、手洗い設備関連（調理室・トイレ以外）14、ベビーベッド・おむつ替え台5、清掃用具など4）。拭き取りは細菌用の市販器材である「ふきとりエースL」（栄研化学）などを用いて保健所職員により行われ、10～20 mLの緩衝液中に拭き取り内容を振出した後、搬入された。

2. 方 法

拭き取り検体は約7 mLを187,000×g、2時間で超高速遠心分離した後、上清を廃棄し、残った沈渣に0.5%Zwittergent添加PBS（－）280 μLを加え溶解し、そのうちの140 μLからQIAampViral RNA Mini Kit（キアゲン）を用いて核酸を抽出した。NoV遺伝子の検出は、厚生労働省通知^{*2}の方法を一部改変して行った。反応試薬としてはQuantiTect Probe RT-PCR Kit（キアゲン）を使用し、One-StepリアルタイムRT-PCR法にて1検体につき1ウェルの測定とした。サイクル数は45とし、Ct値（Threshold cycle）で35以下（GI）、34以下（GII）を陽性とした（検体5 μLあたりのNoV遺伝子数10コピー以上に相当するCt値。データ未掲載）。Ct値が36（GI）あるいは35（GII）以上で増幅を示した検体は2ndリアルタイムPCR検査⁹または遺伝子解析を実施し、増幅が確認できたもの、あるいはNorovirus Genotyping Tool v1.1^{*3}による遺伝子型別が可能であったものも陽性とした。なお、

2ndリアルタイムPCRのテンプレートは、抽出核酸の逆転写により得られたcDNAを鋳型として1st PCRを実施し、そのプロダクトを蒸留水にて10倍希釈したものを用いた⁹。拭き取り陽性検体のうち、22事例から得られた32検体は、厚生労働省通知^{*2}に従ってコンベンショナルRT-PCRを実施し、同一事例内の患者、従事者および食品検体の塩基配列との一致率を比較した。

結 果

1. NoV陽性数

拭き取り検体は1,726検体中65検体（3.8%）がNoV陽性であった（Table 1）。拭き取り陽性検体はすべてNoV検出事例（181事例）由来であり、41事例（22.7%）を占めた。これに対し、NoV不検出事例（78事例）では拭き取り検体からもNoVは検出されなかった。拭き取り検査陽性40事例（従事者検体が搬入されなかった1事例を除く）中32事例（80.0%）で従事者糞便が陽性であった。拭き取り陽性検体32検体（22事例）について、同一事例内の患者糞便（65検体）、従事者糞便（26検体）および食品（3検体）から検出されたNoVの塩基配列を比較したところ、すべての検体で100%一致した。NoV検出事例にお

Table 1. Detection of norovirus (NoV) in swab samples

NoV detection (No. of outbreaks)	Positive (181)	Negative (78)	Total (259)
	No./total (%)	No./total (%)	No./total (%)
Kitchen	6/618 (1.0)	0/272 (0.0)	6/890 (0.7)
Restroom	55/640 (8.6)	0/137 (0.0)	55/777 (7.1)
Other	4/48 (8.3)	0/11 (0.0)	4/59 (6.8)
Total	65/1,306 (5.0)	0/420 (0.0)	65/1,726 (3.8)

Table 2. No. of norovirus (NoV)-positive swab samples and Ct values by different sites in restroom

Site	Toilet bowl	Top of toilet seat	Underside of toilet seat	Floor ^a	Doorknob ^b	Hand washing facility	Underside of seat cover	Multiple ^c	Unknown	Total
No. of positive	24	8	5	4	4	2	1	3	4	55
GII No. of positive	22	8	4	4	4	2	1	2	4	51
Average of Ct value (Range)	31.6 (24.8–39.0)	30.7 (24.4–38.8)	32.3 (26.6–39.4)	34.8 (27.2–39.3)	32.1 (26.2–36.8)	35.5 (29.2,41.7)	25.8	30.3 (26.6,39.4)	32.2 (25.6–39.8)	31.8 (24.4–41.7)
GI No. of positive	3		1					1		5
Average of Ct value (Range)	33.5 (29.8–38.9)		39.4					38.7		35.7 (29.8–39.4)

^a Floor and wall was swabbed in one sample.

^b Include lever handle, flush valve.

^c Details of three multiple swab samples were as follows: toilet bowl and operating button, toilet bowl and underside of toilet seat, and toilet seat and lever handle.

^{*2} 「ノロウイルスの検出法について」（平成15年11月5日付け食安監発第1105001号（最終改正平成25年10月22日付け食安監発1022第1号）

^{*3} <http://www.rivm.nl/mpf/norovirus/typingtool>

いて、拭き取り場所別に陽性率を見ると、調理室では1.0% (6/618検体)、トイレでは8.6% (55/640検体)、その他では8.3% (4/48検体)であり、陽性検体の中ではトイレが最も多く84.6% (55/65検体)を占めていた。調理室拭き取り検体で陽性となった6検体はすべて同一事例に由来するもので、陽性部位はシンクの内壁2か所・排水口・取手・冷蔵庫取手・手洗い器カランであった。本事例では、調理従事者が調理室内シンクで嘔吐したとのエピソードがあった。その他の検体では4事例4検体が陽性であった。内訳は、カーペット、保育園ホールの床・柱、ベビーベッド、モップがそれぞれ1検体であったが、いずれも吐物などに汚染された可能性がある部位であった。

2. トイレにおける部位別の拭き取り検査結果

NoV陽性となったトイレ拭き取り部位は便器が43.6% (24/55検体)で最も多く、次いで便座の14.5% (8/55検体)であった (Table 2)。その他、トイレ内の床やドアノブなどからもNoVは検出された。トイレ拭き取り検体のCt値の平均はGIIで31.8、GIで35.7であったがCt値20以上30未満の検体が40.0% (22/55検体)見受けられた (Table 2)。

考 察

NoV検出事例の約23%では、拭き取り検査においてNoV陽性であった。一方、NoV不検出事例では、NoVは検出されなかった。さらに、拭き取り検体より検出されたNoV遺伝子の塩基配列は、同一事例内の患者、従事者、食品検体から得られた塩基配列と一致した。これらのことから、拭き取り検査結果は、当該事例がNoVによるものであるかを決定する際の根拠の1つとなりうると考えられる。さらに、調理室シンクで嘔吐があった事例や吐物で汚染された部位を検査に供した事例では、拭き取り検査の結果が感染ルートの特定に有用であったと考えられる。しかし、拭き取りが実施されるのは事例発生から数日後になることから、すでに十分な消毒が行われていればNoVは検出されない点や、陽性であっても汚染がいつ、誰により引き起こされたのかまでの断定はできないことなども考慮すべきである。Boxmanら¹⁰⁾は、NoVは集団事例と関係なく検出される可能性のあることなども考慮し、拭き取り検査の結果は、過剰解釈とならないように注意すべきであるとしている。また、拭き取り検査の位置づけについては、食品や臨床検体の検査の追加的ツールとしてみなされるべきであるとし¹⁰⁾、さらに、拭き取り検査は病因物質の特定において価値を有するが、疫学的データを考慮して解釈すべきであると述べている¹¹⁾。本調査においても、拭き取り検査結果は、単独で食中毒の原因究明につながった例はなく、常に疫学調査や臨床検体などの検査結果と併せて解釈することで有効であった。

今回の調査では、便器や便座だけではなく、床や手洗い設備など、トイレ空間内の広い範囲からNoVが検出された。NoV検出事例のトイレ拭き取りでは8.6%が陽性であ

り、さらに、陽性検体の4割がCt値30未満 (検体5 μ LあたりのNoV遺伝子数約 10^3 コピー以上に相当、データ未掲載)であった。これらの検体では、拭き取り液約1 mL中に約 3.4×10^3 コピー以上のNoV遺伝子が存在していたことが推定され、便器だけではなく便座やドアノブなど、手指や身体が触れる部位にも多量のNoVが付着していたことが今回の結果から明らかとなった。Barkerら¹²⁾は、便器水洗により発生した微生物を含むエアロゾルがトイレ空間や便器表面の汚染を引き起こすことを実験により示し、トイレを介した感染拡大の可能性を重大なリスクとして指摘している。われわれのデータも、トイレがNoV感染源として重要であることを改めて示す結果となった。検体採取が事例発生後数日を経ているにもかかわらず、多量のNoVが検出されるような例では、衛生管理が適切に行われていないことを示唆するものと考えられ、保健所などによる指導が必要と考えられる。

オランダでは、NoV集団事例での調理室関連拭き取り検体の28%あるいは29%がNoV陽性であったとの報告もあるが^{10),11)}、本調査では調理室の陽性率は低かった。食中毒調査においては、検食や食品残品などからのNoV検出が重要なカギとなると考えられるが、検食や残品が得られない場合もある。また、食品中に含まれるウイルスは非常に微量であることが多く、通知法でも検出感度が十分とはいえないことが指摘されている¹³⁾。食品や臨床検体が得られない場合では、調理室拭き取りからのNoV検出が食品汚染を示すとされる¹⁰⁾。今後は、調理室からのNoV検出率を向上させることが課題といえる。器材や拭き取り方法も検出率に影響を与えていると考えられ、NoVに特化した拭き取り検査法などの検討を行う必要がある。

今回の結果より、拭き取り検査から得られるデータは、食中毒調査においては、疫学的データや臨床検体からの検出状況と総合して解釈すべきと考える。一方で、嘔吐などによりNoVの濃厚汚染があった場合は清浄化が難しいことや、トイレの衛生管理の重要性も本調査から示すことができた。このことから、拭き取り検査結果は、衛生指導の根拠としても活用できると考える。

謝 辞

稿を終えるにあたり、本調査に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各位に深謝いたします。

文 献

- 1) Garcia, C. *et al.* Asymptomatic norovirus infection in Mexican children. *J. Clin. Microbiol.*, **44**, 2997–3000 (2006).
- 2) Phillips, G. *et al.* Prevalence and characteristics of asymptomatic norovirus infection in the community in England. *Epidemiol. Infect.*, **138**, 1454–1458 (2010).
- 3) Okabayashi, T. *et al.* Occurrence of norovirus infections unrelated to norovirus outbreaks in an asymptomatic food

- handler population. *J. Clin. Microbiol.*, **46**, 1985–1988 (2008).
- 4) Yu, J. H. *et al.* Norovirus infections in asymptomatic food handlers in elementary schools without norovirus outbreaks in some regions of Incheon, Korea. *J. Korean Med. Sci.*, **26**, 734–739 (2011).
 - 5) Jeong, A. Y. *et al.* Occurrence of norovirus infections in asymptomatic food handlers in South Korea. *J. Clin. Microbiol.*, **51**, 598–600 (2013).
 - 6) 生駒俊和他. 新潟県の食品取扱業者におけるノロウイルス感染予防対策の実際と不顕性感染者の頻度. *医学検査*, **64**, 155–162 (2015).
 - 7) Widdowson, M. A. *et al.* Norovirus and foodborne disease, United States, 1991–2000. *Emerg. Infect. Dis.*, **11**, 95–102 (2005).
 - 8) Hall, A. J. *et al.* Vital signs: foodborne norovirus outbreaks—United States, 2009–2012. *MMWR*, **63**, 491–495 (2014).
 - 9) 永野美由紀他. 2ndリアルタイムPCRを用いたノロウイルス陽性確認方法に関する検討. *東京健安研セ年報*, **65**, 47–51 (2014).
 - 10) Boxman, I. L. *et al.* Environmental swabs as a tool in norovirus outbreak investigation, including outbreaks on cruise ships. *J. Food Prot.*, **72**, 111–119 (2009).
 - 11) Boxman, I. L. *et al.* Year-round prevalence of norovirus in the environment of catering companies without a recently reported outbreak of gastroenteritis. *Appl. Environ. Microbiol.*, **77**, 2968–2974 (2011).
 - 12) Baker, J., Jones, M. V. The potential spread of infection caused by aerosol contamination of surfaces after flushing a domestic toilet. *J. Appl. Microbiol.*, **99**, 339–347 (2005).
 - 13) 上間 匡. 食品からのウイルス検出法の現状と課題. *食微誌*, **33**, 121–126 (2016).