

23. 不顕性ノロウイルス感染が食中毒に与える リスクに関する研究

○ 左近直美 (大阪府立公衆衛生研究所)
駒野 淳 (名古屋医療センター)

[研究目的]

ノロウイルスによる食中毒は社会経済に大きな損失をもたらす。近年、不顕性感染者による食品汚染が問題となっており、発症を指標とした対策だけでは十分な対応ができない状況になっている。そこで、本研究では成人における不顕性ノロウイルス感染の疫学調査を実施し、ノロウイルスの季節的流行、感染環、食品汚染に与える影響を明確にし、科学的根拠に基づく費用対効果の高い対策を提案することを目的とする。

[研究の必要性]

ノロウイルスは大規模な食中毒や集団感染の原因となる。食品加工業者は食中毒を引き起こすと経営上極めて甚大な影響を受ける可能性があるため、ノロウイルス対策に神経を尖らせている。ノロウイルスの対策は急性胃腸炎を発症した調理従事者から食品が汚染されるのをいかに回避するかが中心となる。従業員に対する定期的なノロウイルス検査も食品加工業者の代表的な対策の一つである。しかし、依然として十分に奏効していない。その背景には、近年その存在がわかってきたノロウイルスによる不顕性感染者がある。不顕性感染者が定期的な検査で見逃されている可能性がある。不顕性感染による食中毒のリスク回避のため、不顕性感染の系統的な実態把握調査を実施する必要がある。本研究では食品加工業者と連携し大規模な疫学調査を実施して、成人集団における不顕性感染の実態を明らかにする。ノロウイルス生活環に占める不顕性感染のインパクトを理解することで、より効果的なノロウイルス対策の策定に繋がると期待できる。

[研究計画]

以下に示す計画に基づいて実施した。

1. 調理施設における自主的なノロウイルス遺伝子検査の実施実態と不顕性感染の検出状況を把握する。
2. 不顕性感染が発生する頻度を1年間を通じ追跡調査を実施する。
3. 不顕性感染調査にて陽性となったノロウイルスの遺伝子型を決定し、不顕性感染と遺伝子型の関連を調査する。
4. 調査票をもとに不顕性感染になる要因について解析する。
5. 疫学エビデンスを集積し、科学的事実に基づいた効果的なノロウイルス対策を作成する。

検査方法：リアルタイム RT-PCR 法にてノロウイルス遺伝子検査を行い、排泄されるウイルス量を定量する。陽性となった場合は家族における発症状況などを聴取するとともに、ウイルス遺伝子型を決定する。陰転化まで検査を継続して実施することで不顕性感染者からのウイルス排出量、排泄期間、ウイルス遺伝子型を明らかにする。

下痢症の定義はWHOの定義に基づき水様性の下痢便もしくは通常よりも柔らかい便が1日3回以上認められることとなっている。いっぽう、不顕性感染の定義はなく、下痢症状を示さず便中にノロウイルスが排泄されている状態と定義されていることが多い。本調査では下痢と嘔吐症状が1週間以内でないこととした。調査票に記載の胃腸炎症状は嘔吐、嘔気、腹痛、下痢、軟便と幅広い選択肢とした。

[実施内容・結果]

1. ノロウイルス検査に関するアンケート調査

調理関係施設に対し、ノロウイルス検査に関するアンケートを実施した。65施設から回答があった。24施設(36.9%)でノロウイルス遺伝子検査を実施していた。検査は核酸検出に基づく方法で、目的は調理従事者の職場復帰のためが約4割であった。検査実施事例の回答が21事例あり、ノロウイルスは12事例(事例A~L)で検出されていた(表1)。ノロウイルス陰性事例には有症状者12名にノロウイルス遺伝子検査を実施し、全て陰性の事例があり、サポウイルスなどその他の病原物質が推定される事例もあった。事例A~D, Iでは有症者全てにノロウイルスが検出されていた。事例E~HとJでは有症者におけるノロウイルス検出数は7.7%~27%と検出率に差が認められた。検体の採取時期などが影響している可能性が考えられた。事例F, Gの報告は多数の事業所における2月期、3月期の集計であったため、検査対象者数が多くなったと考えられる。また、検査対象者数が多ければ不顕性感染者の存在を検出することが可能であると考えられた。具体的には、事例K, Lが数百名の検査を実施していた。非発症者におけるノロウイルス陽性率はそれぞれ0.30%、0.22%であった。

表 1. 調理関係施設における自主ノロウイルス遺伝子検査実施結果

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L
検査対象者数	20	15	65	1	40	11	11	15	8	19	694	458
うち有症状者	4	3	3	1	19	11	11	13	3	11	30	20
NV陽性者数	4	3	3	1	4	3	3	1	3	2	32	21

2. 不顕性感染調査

従業員にノロウイルス遺伝子検査を定期的実施し、検査陽性者に対する休業補償が提供されている給食等提供事業所の従業員70名から1年間に渡り1回/月で検査検体を採取した。検体採取は毎月第1月曜日を基本とした。

70名の内訳は男性41名、女性29名、構成比1.4:1、平均年齢は42.6歳であった。70名に同一世帯は含まれていない。同居家族がいたのは65名で、そのうち小学生、未就学児がいたのは6名であった(6/65:0.9%)。1年間12回継続して検査を実施できたのは63名、11回が2名、10月から4月までの7回検査を実施したのが5名となり、合計813検体となった。

採取された便検体をPBSにて10%乳剤とし、15,000rpm5分間遠心した上清5μLを用いてリアルタイムRT-PCRにて検出した。リアルタイムにはTaKaRaノロウイルスGI/GII検出キットを用い、Thermal Cycler Dice Real Time System II タカラバイオ, TP900にて測定した。陽性となった検体については、ノロウイルスの遺伝子型別を実施した。上記10%便検体上清200μLから自動核酸抽出装置(PSS)を用いてRNA50μLを抽出し、RT-PCRにて型別領域を増幅した。型別領域はウイルスカプシドタンパクのN末端をコードする領域でGIはG1SKF/G1SKR、GIIはG2SKF/G2SKRプライマーセットを使用した。増幅領域の塩基配列をダイレクトシーケンス法で決定し、Norovirus Genotyping tool (<http://www.rivm.nl/mpf/norovirus/typingtool>)を用いて、遺伝子型別を実施した。

813検体のうちノロウイルスが検出されたのは4検体(0.5%)であった。いずれも1ヶ月以内の海外渡航歴はなく、家族内の胃腸炎出現も認めなかった。このうち、下痢症状を1週間以内に呈していた被験者B, Dは不顕性感染の定義外となり、不顕性感染の検出頻度は0.25%となった。被験者Bでは下痢の症状は比較的緩やかで出勤していた。検出されたノロウイルスの遺伝子型はGI.3, GII.3, GII.4が2件であり、採取は11月にGII.3、12月にGI.3とGII.4、7月にGII.4であった(表2)。国内における非流行期(6月~10月)において1例検出された。陰性化フォロー検査によって陰性化ま

での日数を求めた。ただし、検体採取のタイミングは規定しなかった。陰性化に要した日数はAからDの順に となった。

表2. 健康成人のノロウイルス定期検査陽性事例

陽性被験者	年齢	性別	検出遺伝子型	検出Ct値	検出月	症状(採取日)	症状の開始月/日	子供年齢	排泄期間
A	36	女	GII.3	30.7	11	風邪様	10月30日	1	11
B	39	女	GI.3	22.17	12	下痢	11月29日	3	4~8
C	30	女	GII.4	22.74	12	軟便	11月29日	なし	4~8
D	64	男	GII.4	34.8**	7	軟便	7月2日	なし	13~17

*: 症状開始日から最終陽性確認日～陰性確認日までの日数

** : 7/11日採取

3. リスク解析

通年調査におけるノロウイルス検出時の健康状態について検討した。11月被験者70名中、何らかの胃腸炎症状(下痢、腹痛、軟便、嘔吐、嘔気)があったものが4名、12月同じく70名中2名、7月被験者65名中3名であった。1年間を通して検査時の胃腸炎有症状者は22名であり、月平均1.83人であった。胃腸炎有症状者に対するノロウイルス陽性率は18.2%であった。一方、胃腸炎症状を全く呈していない811人においてノロウイルスは検出されなかった。つまり、今回の不顕性感染調査ではノロウイルス陽性者にいずれも何らかの胃腸炎症状が認められた。家族内の胃腸炎症状もなく、家族構成にも差は認めなかった。

症状開始日の症状についても被験者A,Cは下痢、嘔吐を呈しておらず、本調査で定めた不顕性感染の定義に含まれる。したがって、これまでに報告されている不顕性感染者には多くの軽症胃腸炎が含まれていることが推定される。ノロウイルス感染症は特に流行期に典型的な急性胃腸炎症状だけでなく、サブクリニカルな症状を呈する中に陽性例が含まれている可能性が高いと考えられた。

[考察と今後の課題]

通年性の追跡調査においてノロウイルスを検出することができた。検出頻度は0.5%で、書面調査における非発症者におけるノロウイルス陽性率とよく一致した。ノロウイルスが陽性だった4名すべてで採取時に何らかの胃腸炎症状があった。しかし、そのうち2名はWHOの定める下痢症の基準に当てはまらなかった。このことは、ノロウイルスは下痢症を呈するだけでなく、軽度な症状しか呈さない感染が一定の頻度で存在することを示している。今後、調査票の内容(感染歴、症状の詳細な設問)を検討し、調理従事者の不顕性感染早期探知につながるような調査を実施したい。

夏場も陽性者が見つかったことをふまえると、ノロウイルス対策は通年性で考えなければいけないこと、軟便など軽度な症状も正確に把握した健康調査が今後必要であると推察された。ノロウイルス食中毒対策における不顕性感染を含めた調理従事者の健康管理に反映されたい。

謝辞

アンケート実施に際し、ご協力いただきました大阪食品協会、堺市保健給食課ならびにご回答いただきました調理施設関係者に深謝いたします。また、定期検査にご協力いただきました株式会社一富士フードサービス会社にこの場を御借りしまして感謝申し上げます。

[経費使途明細]

試薬	248,373
英文校正	22,636
検体採取容器、送料等	33,991
合計	305,000
大同生命厚生事業団助成金	300,000