

## 原 著

第 78 回日本感染症学会総会学術講演会座長推薦論文

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

東京都健康安全研究センター

森 功次 林 志直 佐々木由紀子  
野口やよい 甲斐 明美 諸角 聖

(平成 17 年 3 月 9 日受付)

(平成 17 年 5 月 17 日受理)

Key words : *Norovirus*, viral gastroenteritis, asymptomatic carrier, real-time PCR

## 要 旨

*Norovirus* (NV) 集団事例においては、発症者と共通の喫食がある非発症者や、不顕性感染の集団施設職員からも NV が検出される場合がある。食品を介したと推定される集団胃腸炎およびヒトからヒトへの伝播によると推定される集団胃腸炎事例において、発症者および非発症者の糞便中に排出されるウイルス遺伝子量を real-time-PCR 法を用いて測定した。その結果、糞便に含まれる NV 遺伝子量の平均値は  $10^4 \sim 10^6$  copy/g で、発症者群と非発症者群に有意差は認められなかった。この結果から NV の曝露により不顕性感染が成立した非発症者においても、糞便中に多量の NV を排泄している場合のあることが明らかとなった。このような非発症者が調理に従事する場合は新たな食中毒集団発生に、施設等の従事者であれば施設内の胃腸炎流行の拡大に関与する可能性が示唆された。

〔感染症誌 79 : 521 ~ 526, 2005〕

## 序 文

*Norovirus* (NV) による胃腸炎の集団発生の原因は、自然界で NV に汚染されたカキやシジミなどの二枚貝の生食によるものが主と考えられてきた。しかし最近では二枚貝を原因とする事例は全集団事例数の約半数からそれ以下の割合である<sup>1)2)</sup>。代わって、胃腸炎症状を呈する調理従事者、あるいは不顕性感染の調理従事者を介して汚染された食品に起因すると考えられる食中毒事例が報告されている<sup>3)4)</sup>。また、共通の原因食を喫食した集団の中からも NV の不顕性感染者がまれに認められている。一方、保育園や病院などの施設内で

発生する、人から人への感染による集団事例においても、不顕性感染の保育士や看護師などが流行の拡大に関与したと推定されたものが少なくない<sup>2)</sup>。そこで、これら非発症者あるいは不顕性感染者が食品の NV 汚染源、あるいは人への感染源となりうるか否かを明らかにする目的で、発症者および非発症者の糞便中の NV 遺伝子量を測定し比較・検討を行った。

## 材料および方法

## 1. 供試材料

2002 年 10 月から 2003 年 7 月に東京都内で発生した集団胃腸炎事例のうち、NV が検出された事例は 186 事例の発症者 2,220 名、非発症者 273 名、調理従事者 1,066 名を対象とした。調理従事者の発症の有無については不明である。さらに、nested-PCR 法<sup>2)</sup>により患者および非発症者から

別刷請求先 : (〒169 0073) 東京都新宿区百人町 3

24 1

東京都健康安全研究センター微生物部ウ  
イルス研究科 森 功次

平成17年 8 月20日

Table 1 Outline of NV gastroenteritis outbreaks studied

| outbreak No. | date occurred | No. of patient | No. of NV-positives/No. of examined |                |             | type of transmissi |
|--------------|---------------|----------------|-------------------------------------|----------------|-------------|--------------------|
|              |               |                | patient                             | healthy person | food handle |                    |
| 1            | Oct.02        | 21             | 18/25                               | 2/37           | NT          | C                  |
| 2            | Nov.02        | 18             | 24/25                               | 4/30           | NT          | C                  |
| 3            | Nov.02        | 19             | 8/9                                 | 2/3            | NT          | C                  |
| 4            | Dec.02        | 15             | 13/44                               | 1/4            | 0/7         | A                  |
| 5            | Dec.02        | 7              | 5/7                                 | 1/1            | 0/6         | B                  |
| 6            | Jan.03        | 268            | 173/259                             | 1/2            | 8/57        | B                  |
| 7            | Jan.03        | 47             | 23/43                               | 3/16           | 3/6         | B                  |
| 8            | Feb.03        | 107            | 52/85                               | 3/6            | 1/13        | B                  |
| 9            | Mar.03        | 3              | 2/2                                 | 1/1            | 2/8         | B                  |
| 10           | Mar.03        | 30             | 13/18                               | 1/1            | NT          | A                  |
| 11           | Apr.03        | 141            | 49/93                               | 1/5            | 4/8         | B                  |
| 12           | Apr.03        | 45             | 12/34                               | 2/26           | 1/8         | B                  |
| 13           | Jul.03        | 10             | 12/13                               | 1/11           | NT          | C                  |

A : eating of raw oyster B : food handler ( suspected ) C : person to person transmission NT : not tested

NV が検出され、疫学調査結果もあわせて感染経路が推定できた 13 事例のうち、NV の検出された発症者 37 名、非発症者 22 名について糞便試料中の NV 遺伝子量の測定を行った。

また、13 事例中 7 事例では合計 18 名の調理従事者から NV が検出されており、うち 13 名からは複数回にわたって異なる日々に試料が得られたため、これら合計 30 検体について NV 遺伝子量の測定を行った。

## 2. Real-time PCR 法

供試した糞便試料を遠心操作により精製し、Proteinase K、および CTAB を用いて NV の RNA を抽出した<sup>2)</sup>。NV 遺伝子量の測定はウイルス性下痢症診断マニュアル<sup>3)</sup>に記載された方法にもとづいた Realtime-PCR 法により ABI PRISM 7000 (ABI) を用いて行った。すなわち糞便試料中から抽出した RNA を random primer を用いて逆転写反応を行った後、COG2R/COG2F のプライマーペアと RING2TP プロブを用い、96 15 秒、56 1 分、45 サイクルで Realtime-PCR 反応を行った。NV 遺伝子の定量値は糞便試料から抽出した RNA を Realtime-PCR 反応させる際に、国立感染症研究所から分与された定量用のコントロールについて希釈列を作製して同時に反応させ、得られた測定値から作製した検量線により求めた。

なお、今回の糞便中の NV 量の測定に供した検体は、通常の集団胃腸炎検査時にハイブリダイゼーション法<sup>2)</sup>によりすべて遺伝子型 GII に属することが確認されていたことから、Realtime-PCR 法では GII 遺伝子の検出のみを実施した。

## 3. 検出された NV の塩基配列の解析

原因食品にカキの関与していない事例のうち、nested-PCR 法による糞便検査で、電気泳動で明瞭なバンドが得られた 8 事例の発症者 14 件、非発症者 13 件および調理従事者 11 件の PCR 産物について、ダイデオキシ法によるダイレクトシーケンスを用いて塩基配列の解析<sup>6)</sup>を行った。

## 成 績

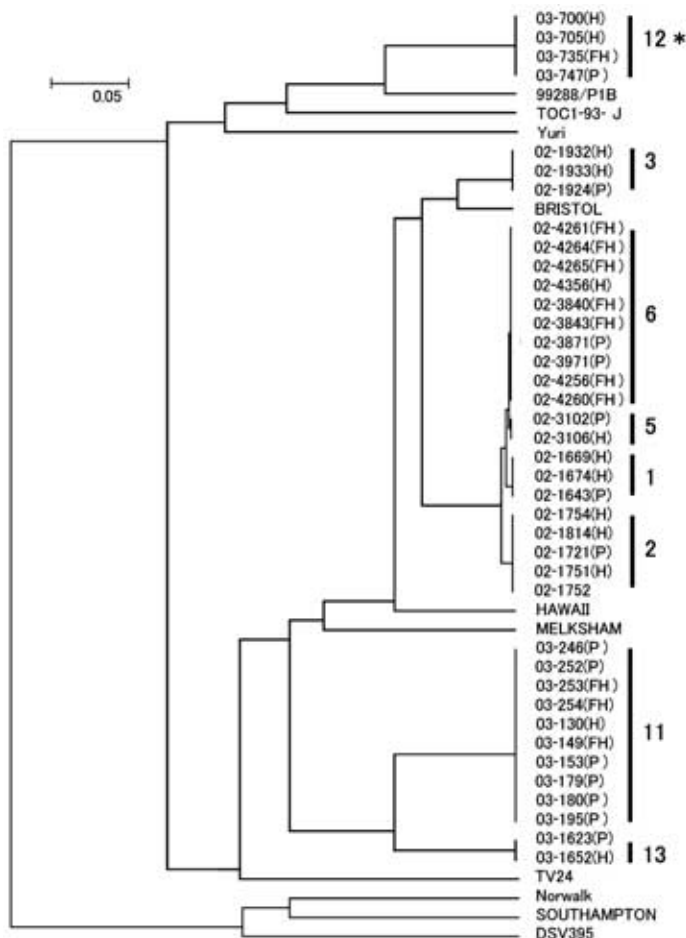
### 1. NV 検出状況

2002 年 10 月から 2003 年 7 月に東京都内で NV が検出された集団胃腸炎は 186 事例であった。これら 186 事例のうち、発症者からの NV 検出は 2,220 名中 1,422 名 (64.1%)、非発症者からの NV の検出は、試料数は少なかったが 273 名中 35 名 (12.8%) であった。非発症者から NV が検出された事例は 27 事例 (14.5%) であり、これらの事例で疫学調査成績とあわせて感染経路が推定できたものは 13 事例であった。その概略を Table. 1 に示した。一方、調理従事者から NV の検出された集団事例は、186 事例中 36 事例 (19.4%) であり、発

Fig. 1 Distribution of NV-sequence in 8 outbreaks. These outbreaks was suspected occurred by the same virus each, indicated with that there were the same sequences on each outbreak.

\* : outbreak No. in Table1

( P ): patient ( H ): healthy person ( FH ): food handler



症の有無は不明であるが 1,066 名中 93 名 ( 8.7% ) から NV が検出された .

## 2 . 塩基配列の解析

感染経路の推定できた 13 集団事例( Table 1 )の発症者と非発症者および調理従事者から検出された NV の塩基配列を調べ , 系統樹解析を行った結果を Fig. 1 に示した . いずれの事例においても同じ集団に含まれる発症者と非発症者および調理従事者から検出された NV 遺伝子の塩基配列は同一であった .

## 3 . 糞便中に排出される NV 遺伝子量の比較

食品を介して発生したと考えられる事例 ( 事例 No. 4 ~ 12 ) の発症者と非発症者について推定原因食品喫食後における糞便中の NV 遺伝子量の分布を Fig. 2 に示した . NV 遺伝子量は喫食後の時間経過とともに減少する傾向がみられたが , 発症者と非発症者の排出遺伝子量に明確な差は認められなかった . Fig. 3 はこれらの事例について , 糞便中に排出された NV 遺伝子量の分布を発症者 , 非発症者および調理従事者の群別に示したものであ

Fig.2 Distribution of the number of fecal NV genome copies of patient and NV-detected healthy person, with days after consumption of vehicle foods. There is not significant difference on the distribution.

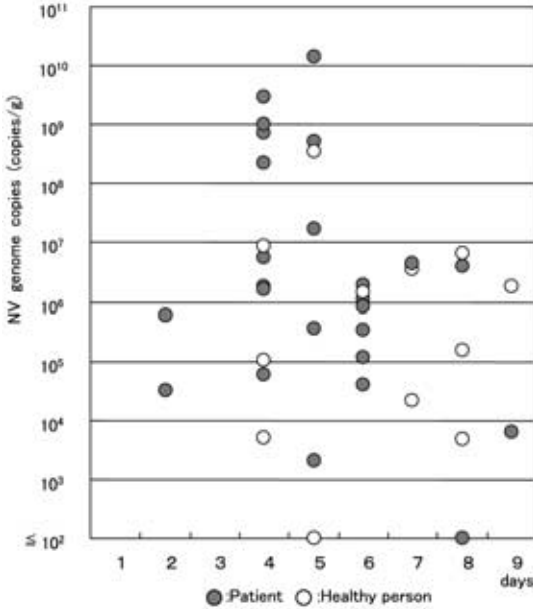


Fig.3 Distribution of the number of fecal NV genome copies in feces of food-borne infectious cases. There is no significant difference among any groups on distribution of viral genome copies.

$p_1$ ( Patient-Healthy Person )= 0.3435,  $p_2$ ( Patient-Food Handler )= 0.2956,  $p_3$ ( Healthy Person-Food Handler )= 0.9831

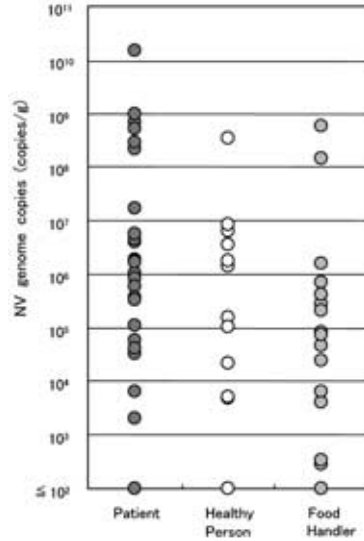
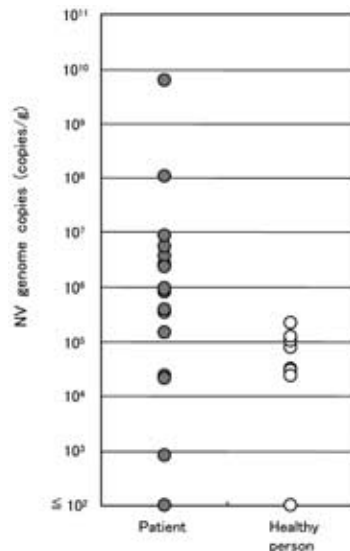


Fig. 4 Distribution of number of the number of fecal NV genome copies in feces of person-to-person transmission cases.

There is no significant difference among both groups on distribution of viral genome copies  $p_4$  ( Patient-Healthy Person )= 0.4418



る．各群の相乗平均値は発症者群で  $1.82 \times 10^6$  copy/g, 非発症者群で  $2.69 \times 10^5$  copy/g, 調理従事者群で  $2.03 \times 10^4$  copy/g であった．各群の NV 排出量の差を検定したところ, その危険率( $p_1$ )は発症者群 非発症者群間で  $p_1 = 0.3435$ , 非発症者群 調理従事者群で  $p_3 = 0.9831$ , 発症者群 調理従事者群で  $p_2 = 0.2956$  と, いずれの群の間にも有意差は認められなかった．

次に, ヒトからヒトへの伝播が考えられた事例(事例 No. 1~3, 13)について, 発症者と非発症者の糞便中の NV 遺伝子量の分布を Fig. 4 に示した．各群の糞便中の NV 遺伝子量の相乗平均値は発症者群で  $1.58 \times 10^5$  copy/g, 非発症者群で  $2.93 \times 10^4$  copy/g であり, NV 排出量を比較した結果  $p_4 = 0.4418$  で両群に有意差は認められなかった．

4. 調理従事者における糞便中の NV の消長

糞便中の NV の消長を調べる目的で, 複数回にわたって試料が得られた調理従事者 13 名 30 検体について糞便中の NV 遺伝子量を調べた成績を

Table 2 The number of NV genome copies in feces of food handlers with carrying days

| Sample | NV genome copies (copies/g) |                               |                               |                               |      |      |
|--------|-----------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|------|------|
|        | 1st time                    | 2nd time (days <sup>*</sup> ) | 3rd time (days <sup>*</sup> ) | 4th time (days <sup>*</sup> ) |      |      |
| A      | 640,150                     | 47,224 (7)                    | +                             | (17)                          | +    | (32) |
| B      | 25,834                      | +                             | (7)                           | +                             | (14) |      |
| C      | 1,758                       | +                             | (12)                          | +                             | (22) |      |
| D      | +                           | +                             | (7)                           |                               |      |      |
| E      | 2,860,000                   | +                             | (12)                          |                               |      |      |
| F      | 4,024                       | +                             | (5)                           |                               |      |      |
| G      | 41,897                      | +                             | (12)                          |                               |      |      |
| H      | 3,616                       | +                             | (18)                          |                               |      |      |
| I      | 2,112                       | +                             | (11)                          |                               |      |      |
| J      | 15,868                      | +                             | (11)                          |                               |      |      |
| K      | 3,020,000                   | +                             | (11)                          |                               |      |      |
| L      | 4,617                       | +                             | (11)                          |                               |      |      |
| M      | 705,124                     | +                             | (7)                           |                               |      |      |

\* : days after the first examination of feces

+ : positive by nested PCR ( < 100 copies/g by realtime PCR )

Table 2 に示した .NV の検出された調理従事者は 1 から 2 週間後の再検査時に陰性となる場合が大半であった .しかし ,nested-PCR 法により初回検査時から 22 日後 ,32 日後まで NV が検出された例も認められた .これら 2 週間以上経過して NV が検出された例では ,遺伝子量は糞便 1g あたり 100copy 未満であった .

### 考 察

1997 年に食品衛生法で NV が食中毒病原物質に追加指定されて以来 ,毎年 NV による集団胃腸炎の報告数が増加し ,最近では原因物質として NV は常に上位に位置している .このように NV による食中毒が増加している背景として ,NV 食中毒は従来考えられていた生カキの関与した冬季に集中した発生のみでないことが考えられる .さらに食品を介さず食中毒として扱われない ,施設内での胃腸炎流行の事例もあわせると NV による胃腸炎患者数はさらに大きいものと推定され ,その予防策の構築が求められている .

2002 年 10 月から 2003 年 7 月にかけて東京都内で NV の検出された集団胃腸炎はのうち非発症者から NV が検出され ,かつ ,感染経路が推定できたものは 13 事例であった .その内訳は ,非発症者も発症者と共通の食品を喫食していた ,すなわち食品を介したと推定された事例が 9 事例 ,幼稚

園 ,保育園老人施設など施設内の胃腸炎流行で ,食品を介さないヒトからヒトへの伝播が考えられる事例が 4 事例であった .これらの 4 事例で NV の検出された非発症者は ,いずれも園児や入所者などの施設利用者 ,および教員や介護職員などの施設従事者であった .

一方 ,調理従事者から NV の検出された集団胃腸炎事例が 186 事例中 36 事例 (19.4%) あり ,発症者と同一の食品を調理従事者が摂食する可能性を考慮にいれても高率であると考えられる .

本研究で ,発症者および非発症者から検出された NV の塩基配列の比較を行った事例では ,両者の塩基配列がいずれの事例においても一致していたことから ,これら非発症者は発症者と同一の NV に曝露されたものと考えられた .NV の感染の成立には血液型物質など宿主側のレセプターが関与するという報告もなされているが<sup>7,8)</sup> ,同一の NV に曝露され感染が成立しているにもかかわらず ,不顕性感染となる原因については ,摂取したウイルス量や宿主に依存した別の機構が関与するものと推定される .

また ,今回の検討の結果 ,NV に汚染された食品の喫食や汚物処理などで NV に曝露された場合にも ,糞便中に NV を排出している非発症者が存在することが明らかとなった .しかもこれら非発症

者から排出されている NV 量は  $10^6$  copy 以上の例もあり、発症者と差がみられない量であることも明らかとなった。同様の結果は食中毒事件発生施設の食品取扱者においても得られており<sup>9)10)</sup>、発症者と同レベルのウイルス量を排泄している非発症者の存在は、その人が調理作業を介して新たな集団例を起こす可能性があり、介護などにあたる施設の職員であれば施設内流行の拡大に關与する可能性の大きいことを明確に示唆するものであろう。さらに、調理従事者については感染から発症にいたる潜伏期間中に食品汚染を招いた可能性が疑われる事例も報告されている<sup>11)</sup>。今後、NV 集団胃腸炎の予防策を講じる上で発症者への対応のみならず、非発症者対策、特に調理従事者や介護、看護職員等に対する感染防止、あるいは不顕性感染者の検知と NV 保有者に対する対策が重要であり、あわせて広範な啓蒙活動の必要性が示唆された。

#### 文 献

- 1) 日本臨床ウイルス学会：ウイルス検査法，臨床と検査室のための手引き．臨床とウイルス 1995；23：supplement.
- 2) 林 志直，森 功次，野口やよい，佐々木由紀子，中村敦子，長島真美，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（1997年11月～2000年3月）．東京衛研年報 2000；51：8-13.
- 3) Marshall JA, Hellard ME, Sinclair MI, Fairley CK, Cox BJ, Catton MG, *et al.* : Failure to detect norovirus in a large group of asymptomatic individuals. *Public Health* 2004；118：230-3.
- 4) Parashar UD, Dow L, Fankhauser RL, Humphrey CD, Miller J, Ando T, *et al.* : An outbreak of viral gastroenteritis associated with consumption of sandwiches : implications for the control of transmission by food handlers. *Epidemiol Infect* 1998；121：615-21.
- 5) 国立感染症研究所：ウイルス性下痢症診断マニュアル（第3版）：2003.
- 6) Sanger F, Nicklen S, Coulson AR : DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1977；74：5463-7.
- 7) Harrington PR, Vinje J, Moe CL, Baric RS : Norovirus capture with histo-blood group antigens reveals novel virus-ligand infections. *J Virol* 2004；78：3035-45.
- 8) Meyer E, Ebner W, Scholz R, Dettenkofer M, Daschner FD : Nosocomial outbreak of norovirus gastroenteritis and investigation of ABO histo-blood group type in infected staff and patients. *J Hosp Infect* 2004；56：64-6.
- 9) 西尾 治，吉澄志磨，野田 衛：ウイルス性食中毒について 特にノロウイルスおよびA型肝炎ウイルス．日食微誌 2004；21：179-86.
- 10) 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，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 2004；32：189-94.
- 11) Gaulin C, Frigon M, Poirier D, Fournier C : Transmission of calicivirus by foodhandler in the pre-symptomatic phase of illness. *Epidemiol Infect* 1999；123：475-8.

#### Comparison of the Number of *Norovirus* Genome Copies in Patients and Healthy Persons

Kohji MORI, Yukinao HAYASHI, Yukiko SASAKI, Yayoi NOGUCHI,  
Akemi KAI & Satoshi MOROZUMI  
Tokyo Metropolitan Institute of Public Health

In viral gastroenteritis outbreaks occurred by Norovirus ( NV ) NV was detected not only from patients but also from healthy persons who have taken the same food, and also detected from healthy staff members working at community places such as hospital, school and nursing home. The number of fecal NV genome copies of patients, healthy persons and food handlers are examined by real-time PCR method, to investigate foodborne gastroenteritis and person to person transmission outbreaks. There is no significant difference on the number of NV genome copies in feces between patients, and NV-detected healthy persons. Those result indicate asymptomatic carrier of NV who were working as food handlers or staff members at community places will become an origin of food-borne gastroenteritis or person to person transmission outbreaks.