

ふき取り検体からのノロウイルス検出法の改良及びウイルスモニタリングに関する研究

○谷澤由枝¹⁾, 重本直樹¹⁾, 高尾信一¹⁾, 野田衛²⁾

¹⁾ 広島県立総合技術研究所 保健環境センター, ²⁾ 国立医薬品食品衛生研究所

背景・目的

ウイルス性食中毒発生時の検査では患者便、調理従事者便、原因と疑われる食品の検査に加え、調理施設からのウイルス検出も重要な検査事項である。昨年度の本学会において、「ふき取り検体からのヒドロキシアパタイト (HAP) によるノロウイルス (NoV) の濃縮法の検討」について報告したが、更なる検出感度の向上および検査の簡略化を目的に、検査法の改良を検討した。また、人が集まる公共施設のトイレ周辺は、流行期にはNoV感染リスクが高まると考えられるが、具体的なデータがない。そこで、改良法を用いた公共施設のトイレ周辺におけるNoVモニタリング調査を行い、感染リスクを明らかにした。

研究方法

1. ふき取り検体からのNoV検出法の改良

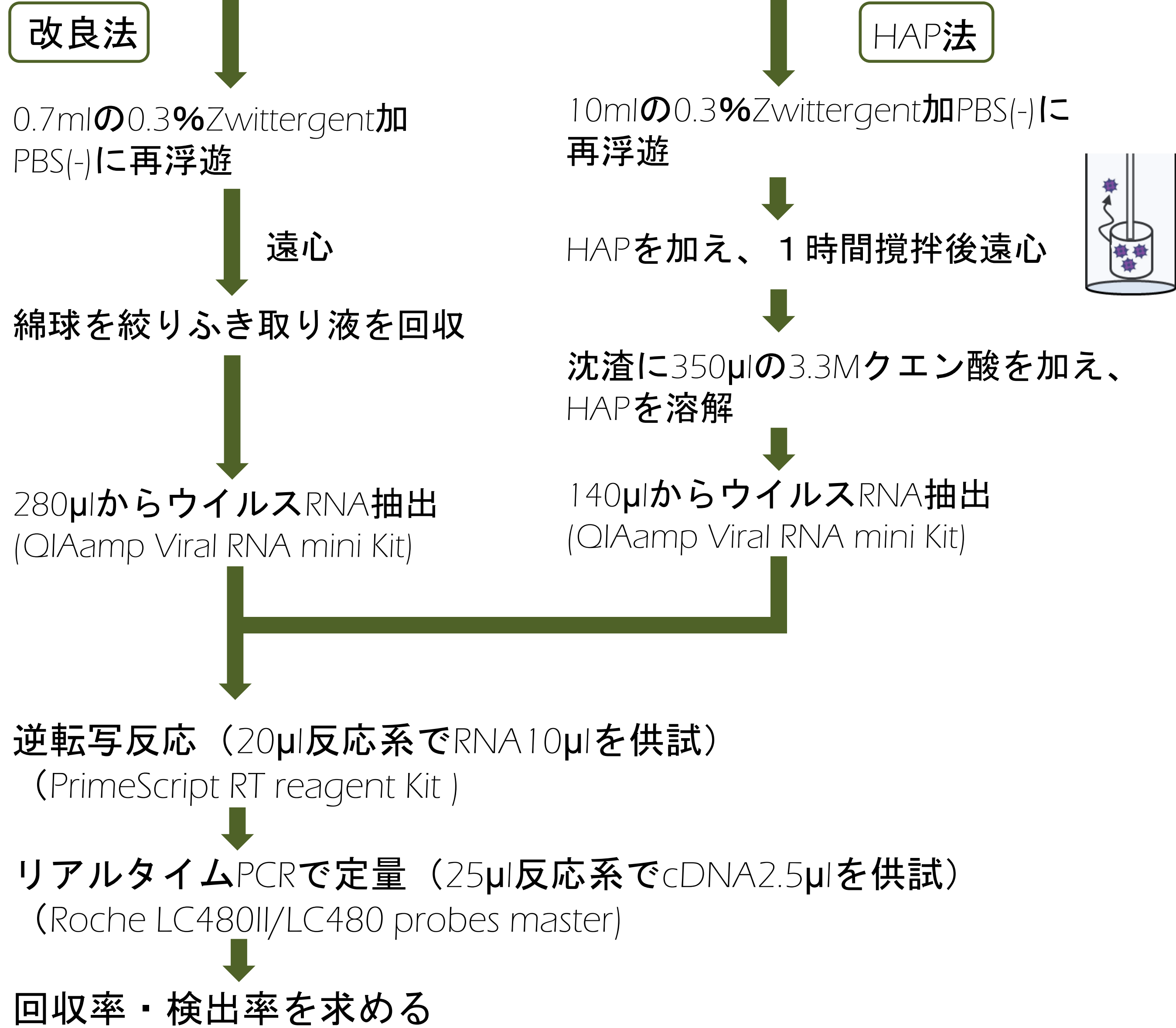
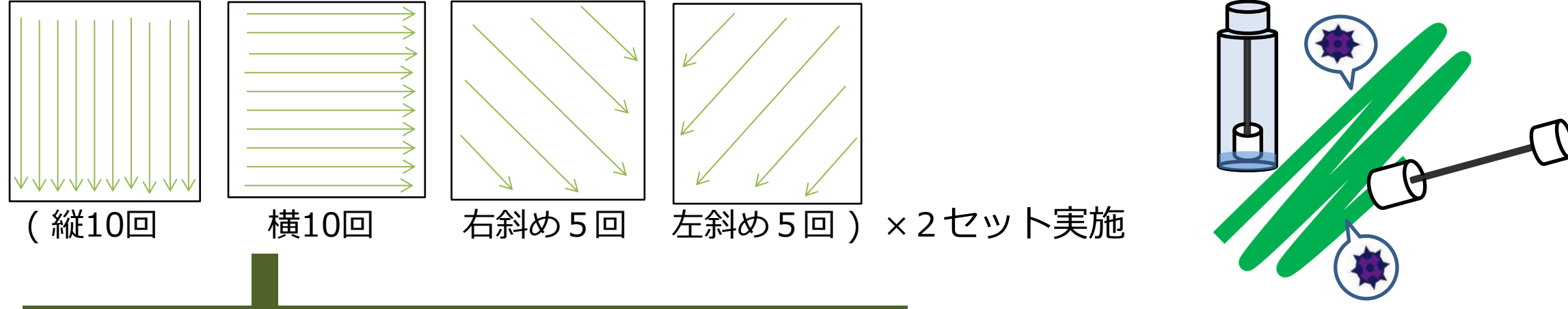
材料 BMフキトレールA (GSI Creos)
NoV GII.17陽性の10%便乳剤
10cm×10cmに区画した滅菌ステンレストレー



方法 各区画に希釈した10%糞便乳剤140μlを塗布。

60分間自然乾燥 (模擬検体作成)

0.3% Zwittergent加PBS(-)に湿らせたふき取り棒で、ふき取り操作を2セット実施。(1セット: 縦10回, 横10回, 右斜め5回, 左斜め5回)



2. 公共施設トイレにおけるNoVモニタリング

実施期間 平成28年10月～平成29年2月
対象施設 公共施設内のトイレ (県内9施設A～I)
ふき取り部位 洋式トイレ1個室につき4カ所ふき取りを実施
①便座裏 ②内鍵またはドアノブ
③ペーパーホルダー ④水洗レバーまたは手すり



方法 改良法にてふき取り検体の採取及び核酸抽出を実施
Nested Real-time PCR法によりNoV陽性・陰性を判定

NoV陽性検体 → • Real-time PCR法による定量
• Nested PCR産物のダイレクトシーケンスにより遺伝子型別 (Capsid N/S領域)

結果 1

改良法及びHAP法の検出率及び回収率

方法	便乳剤希釈率	塗布量 (ゲノムコピー)	検出率 (陽性数/検査数)	回収率 (%)
改良法	原液	1.7 ~ 2.1 × 10 ⁵	6/6	42.1 ~ 62.9
	10倍	2.0 ~ 2.1 × 10 ⁴	6/6	38.0 ~ 63.7
	100倍	2.1 ~ 2.7 × 10 ³	6/6	34.4 ~ 111.9
	1000倍	3.0 ~ 4.8 × 10 ²	3/6	81.3 ~ 134.6
HAP法	原液	2.2 × 10 ⁵	5/5	24.9 ~ 61.7
	10倍	1.5 × 10 ⁴	5/5	30.4 ~ 60.9
	100倍	3.4 × 10 ³	3/5	23.0 ~ 32.1

- 10³コピー程度を塗布した場合、改良法では6区画中全ての区画から、HAP法では5区画中3区画から検出可能であった。
- 回収率: 改良法で34.4%以上、HAP法で23%以上。

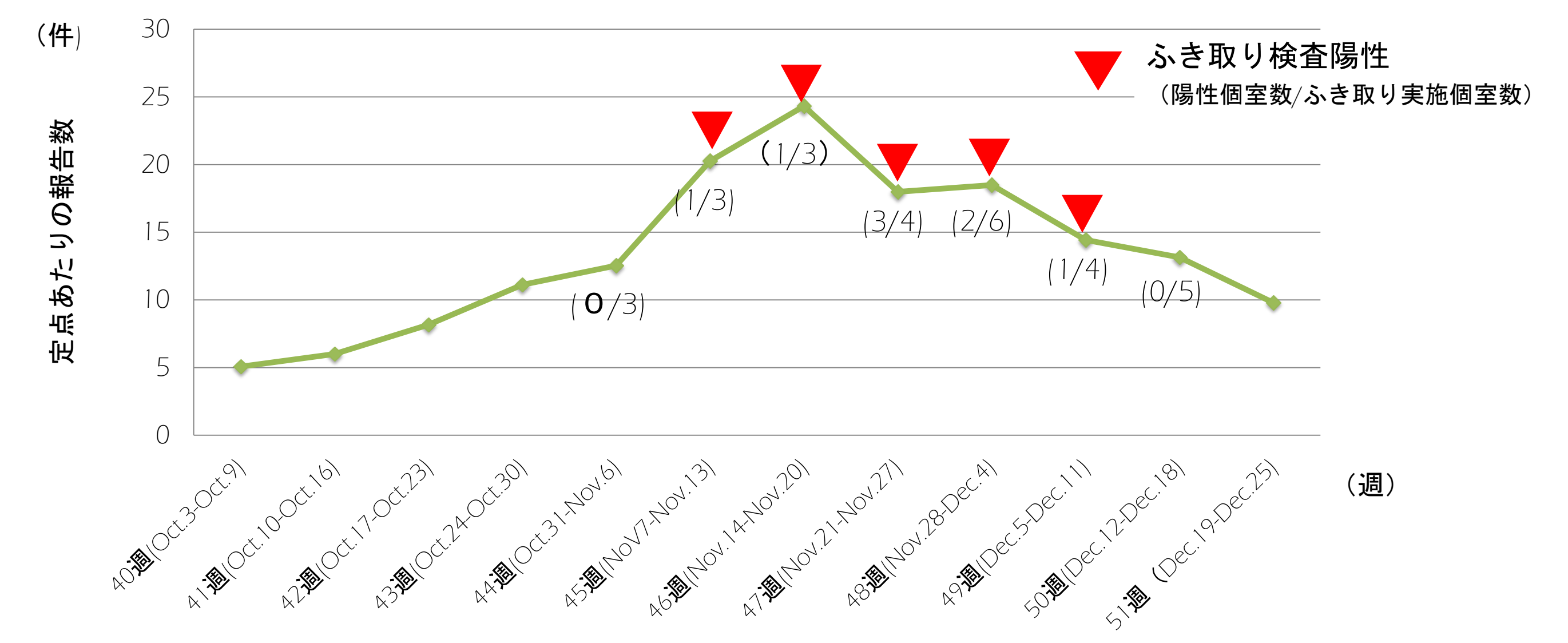
結果 2

NoV GII陽性検体の検体採取日、ふき取り場所及び定量値

ふき取り場所	検体数	NoV GII陽性数	遺伝子型	検体採取日	ふき取り場所 (施設記号)	定量値 (コピ- / 検体)	
内鍵orドアノブ	42	0	GII.2	Nov.13	便座裏 (C)	1.1 × 10 ⁴	
ペーパーホルダー	42	1		Nov.27	便座裏 (C)	1.0 × 10 ⁴	
便座裏	46	7		Dec.3	便座裏 (H)	6.7 × 10 ⁵	
水洗レバーor手すり	38	0		Dec.4	便座裏 (C)	1.6 × 10 ³	
				Dec.10	便座裏 (H)	1.6 × 10 ³	
				GII.6	Nov.19	ペーパーホルダー (D)	6.0 × 10 ²
				GII.7	Nov.23	便座裏 (E)	3.4 × 10 ³
				GII.17	Nov.27	便座裏 (F)	4.5 × 10 ³

- 9施設中5施設で陽性となり、ふき取り場所別では、便座裏及びペーパーホルダーからNoV GIIが検出された。
- 検出されたNoV遺伝子型の多く (5/8検体) は、2016/17シーズンに全国的に流行したNoV GII.2であった。

定点当たりの感染性胃腸炎患者報告数 (広島県) とふき取り検体からのNoV検出状況 (10-12月抜粋)



- ふき取り検体からNoVが検出された時期は、感染症発生動向調査 (広島県) の定点当たりの患者報告数が増加した時期と一致していた。

まとめ

本法の改良点は以下の2点。①ふき取り時に綿球等に浸す液及びウイルスの回収の際の再浮遊液を少量(0.7ml)の0.3% Zwittergent 加PBS(-)にする。②核酸抽出に供する試料の量を140μlから280μlに増やす。これにより、濃縮行程なしでも効率的にNoVを検出できた。また改良法は、HAP法と比べ短時間で処理可能であり検出感度も向上した。

改良法を用いた、公共施設のトイレ周辺のふき取りによるNoVモニタリング調査の結果、感染性胃腸炎流行期の公共施設トイレは、高率にNoVに汚染されており、感染リスクがあることが確認された。便座以外に、ペーパーホルダーからもNoVが検出されたことから、ペーパーホルダーを介して感染する可能性が示された。

