

食品従事者検査から伺えること 配布抜粋資料

研究開発とルチン検査

第65回食品微生物懇話会

横浜市衛生研究所撮影

<https://www.city.yokohama.lg.jp/kurashi/kenko-iryo/eiken/kansen-center/shikkan/na/srsv1.html> より引用

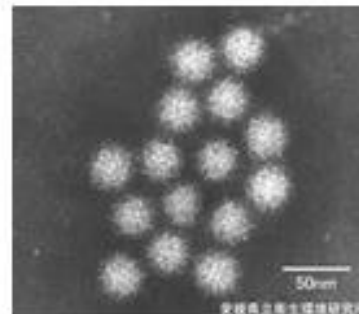
研究開発(SRSVプライマー開発の着目)

1. 電子顕微鏡による形態確認

古い方法
感度中程度



糞便直接見る



電顕法

- 1990年に NV 遺伝子の塩基配列が解明されて以来、迅速かつ高感度な RT-PCR 報告されるが、これらプライマーセットは、電子顕微鏡でウイルス粒子が観察された検体の約 70% のウイルス検出が可能でしたが、検出できない NV 存在

2. NV遺伝子を見つける(遺伝子増幅法)

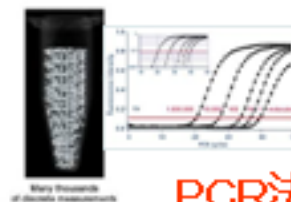
新しい方法
最も感度良い



PCR装置で増や



Microfluidic PCR reactions
are independent, single
amplification events



PCR法

ノロウイルス研究の歴史

- 1972年 米国カピキアン博士がTEM*で発見(SRSV**)
- 1990年 SRSV全塩基配列(5株)が報告
PCRにより同一性確認が可能
- 2000年 遺伝子型が複数あるらしい・・・G1,G2、
TEM +でもPCRで検出されない株がある
- 検出法の精度向上に着手
#プライマーの最適化
#拡散抽出法の改良
- 2002年 BMLで高感度プライマーと抽出法の報告

TEM* :透過電子顕微鏡 J Virol. 1972 Nov;10(5):1075-81.

SRSV** : **Small Round Structured Virus** (小型球形ウイルス)

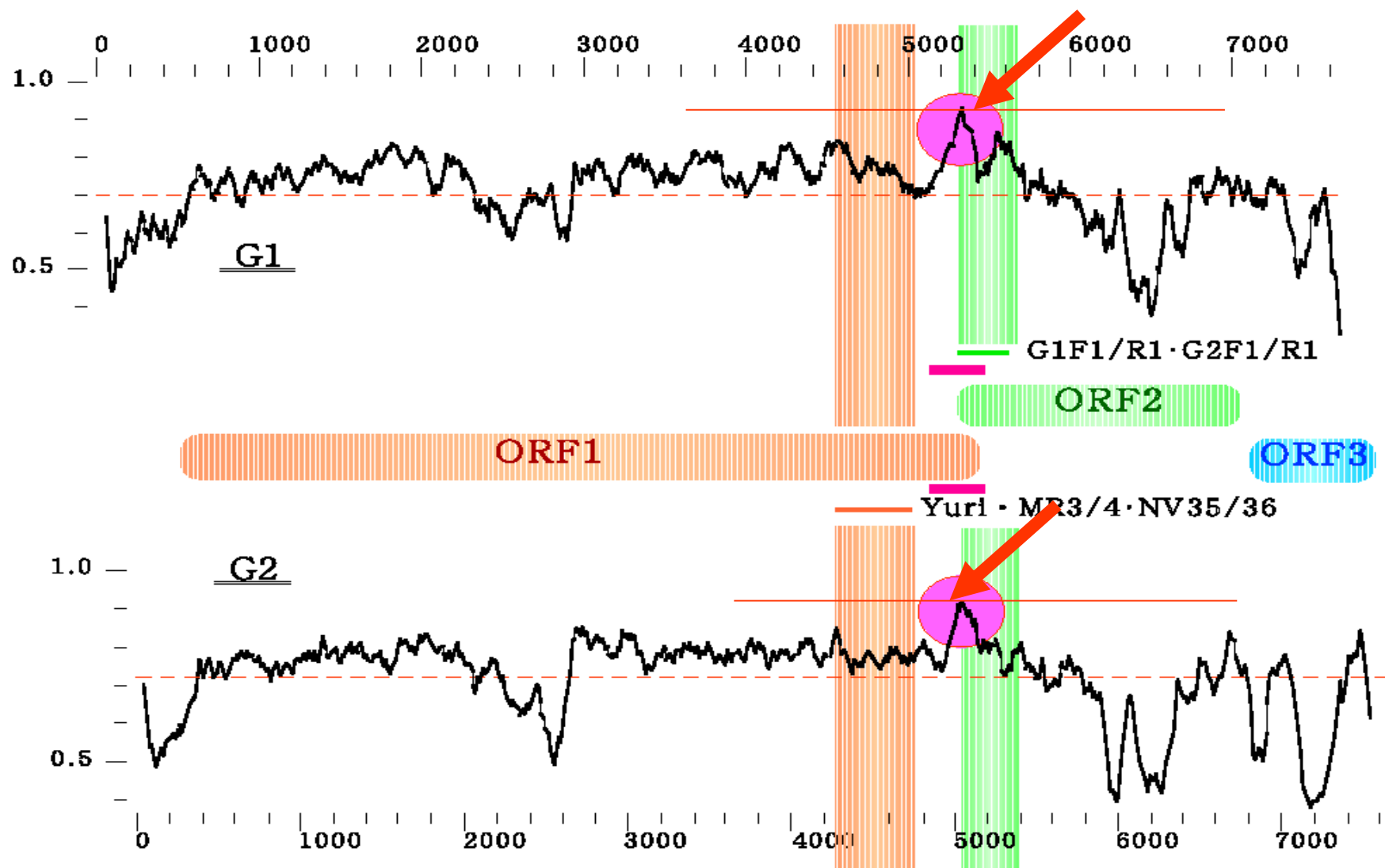


図1 G1とG2の全長核酸の相同性

● は最も保存性の高い領域(ORF1/ORF2ジャンクション)を示す。— は従来用いられてきたRdRp領域のプライマー部位を示す。— は従来用いられてきたキャプシド領域のプライマー部位を示す。— は今回新たに用いたプライマー/プローブ部位を示す。--- は全長核酸の相同性の平均値を示す。

図2 ORF1/ORF2ジャンクション領域の塩基配列とG1,G2特異的プライマーおよびプローブ配列

新しいリアルタイムPCR法の検出感度

	RT-PCR法(キャプシド領域)	リアルタイムPCR法
G1	9／80	9／80
G2	43／80	61／80
G1＋G2(重複)	8／80	9／80
検出不可	20／80	1／80
Total(検出率)	60／80(75. 0%)	79／80(98. 8%)

検査キットの変遷

デンカ生研EIA



BML開発した高感度プライマーを使用

島津ノロウイルス

takaraノロウイルス



2000年デンカ

島津

検討

2012

タカラ

検討

2008年10月 島津

タカラ 2016G1/G2

2005年対外診断医薬品

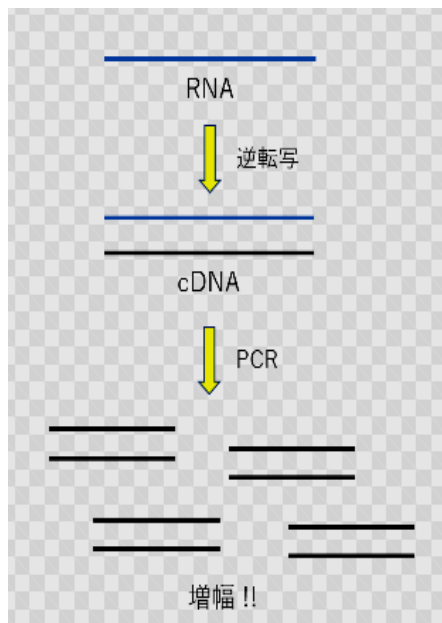
BMLが診療対象で受託

診療対象EIAを専門受託

BFS食品事業者PCR 研究用試薬で供給



RNA抽出→逆転写(cDNA)

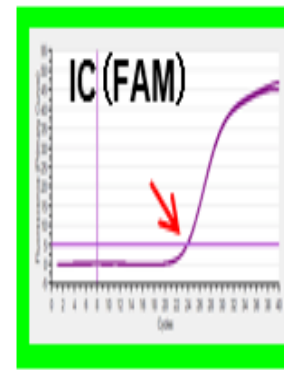
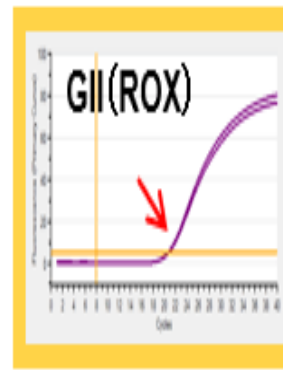
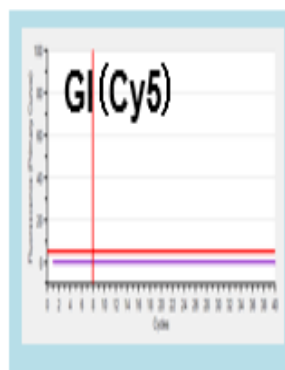


リアルタイムPCR反応と検出 ↓

判定イメージ

GI(Cy5)、GII(ROX)の増幅曲線を確認。

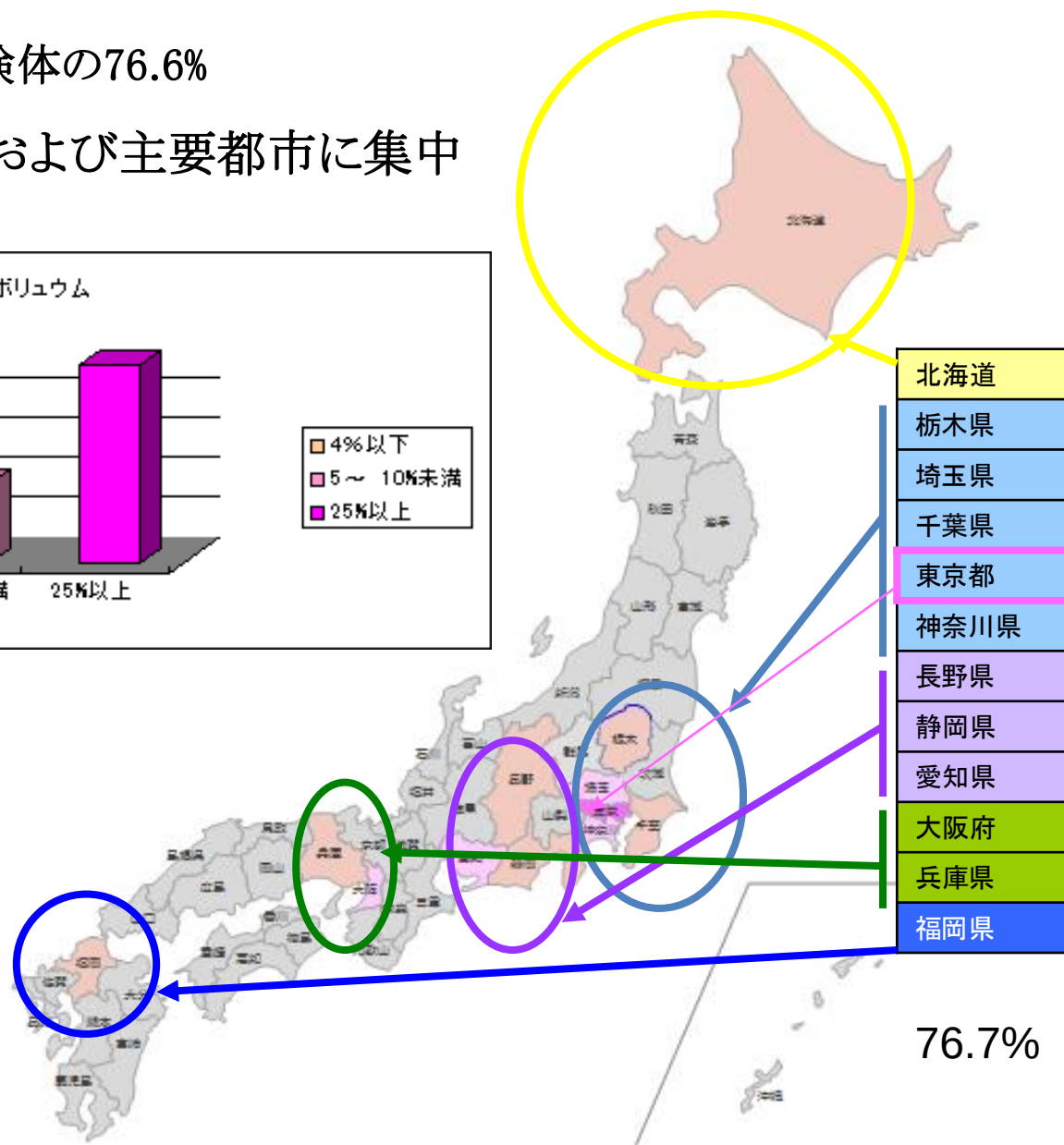
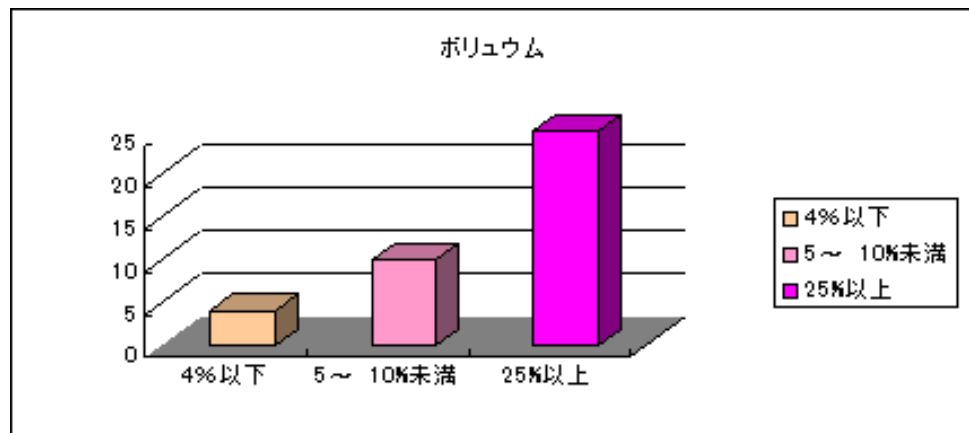
ともに増幅が無い場合はIC(FAM)の増幅結果からPCR阻害の有無を確認。



蛍光判定

44都道府県に及ぶ検体の76.6%

12都道府県で関東および主要都市に集中



2011年10月から2019年4月の検査結果を 以下の項目で解析

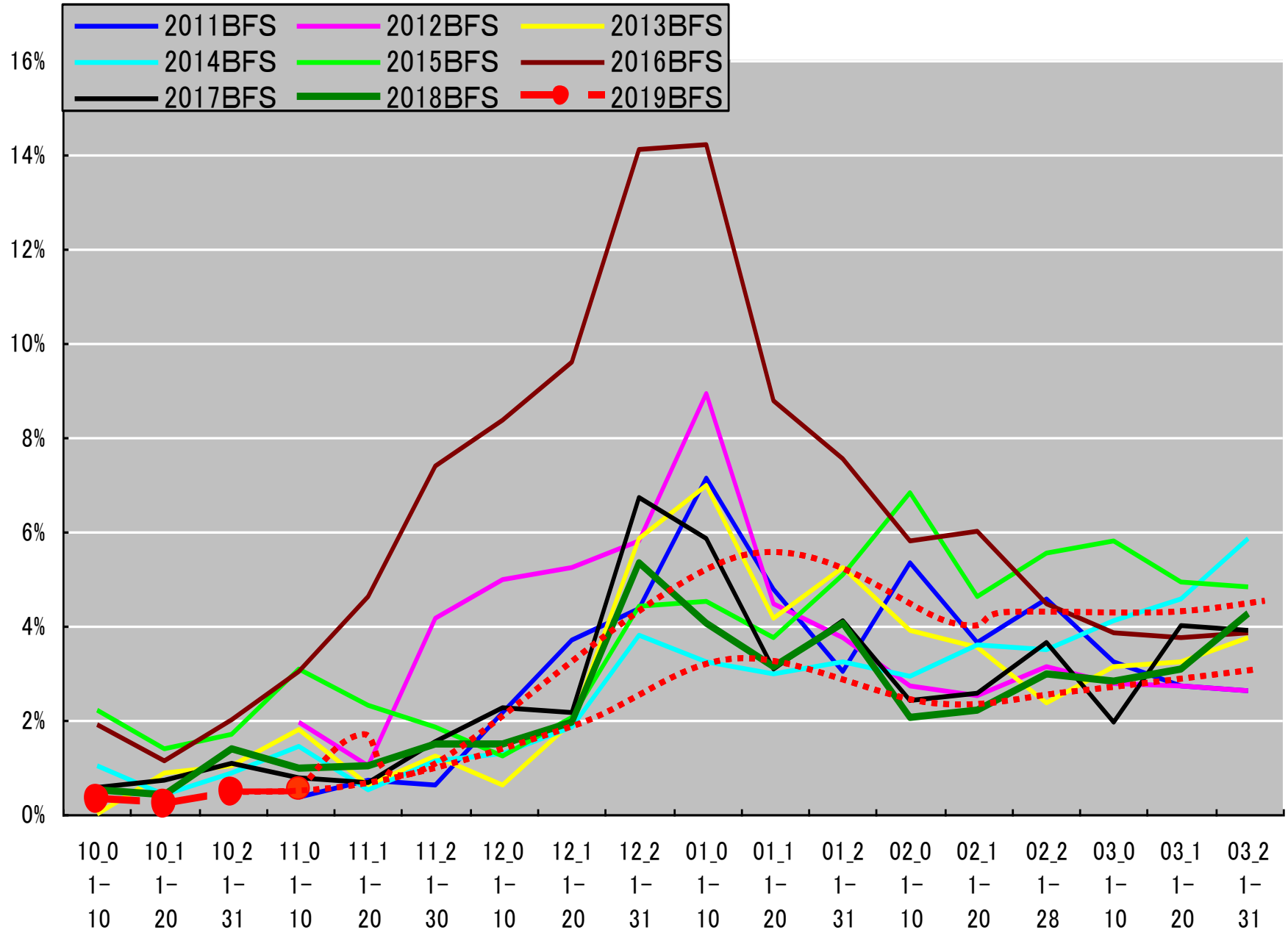
1. 10日間毎の検査陽性率(公的感染指数と比較評価)
2. 保有ウイルス期間はどれほどか
3. 地域や業界による陽性率に差はあるのか
4. 遺伝子型 G1,G2,G1+G2の推移
5. なぜ排菌は続くのか、抗体はできるのか
6. どの程度の検査日数間隔が適当か

10日間毎の検査陽性率(公的感染指数と比較評価)

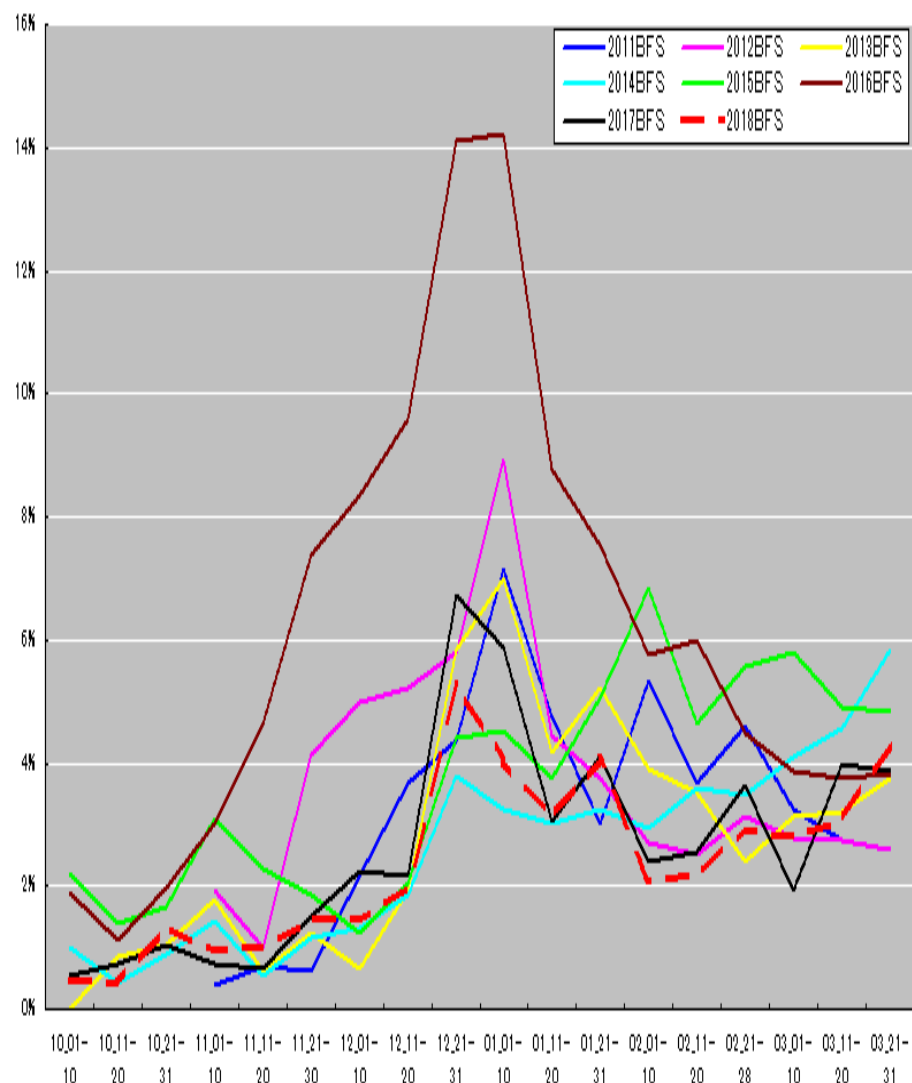
陽性率BFS週間指数

月 10日間	2011BFS	2012BFS	2013BFS	2014BFS	2015BFS	2016BFS	2017BFS	2018BFS
10_01-10			0.00%	1.00%	2.22%	1.88%	0.55%	0.52%
10_11-20			0.86%	0.41%	1.40%	1.13%	0.72%	0.43%
10_21-31			1.05%	0.90%	1.67%	1.98%	1.06%	1.36%
11_01-10	0.37%	1.93%	1.79%	1.43%	3.08%	3.01%	0.75%	0.97%
11_11-20	0.71%	1.01%	0.63%	0.53%	2.29%	4.64%	0.66%	1.02%
11_21-30	0.64%	4.13%	1.24%	1.14%	1.85%	7.39%	1.52%	1.46%
12_01-10	2.16%	4.97%	0.64%	1.30%	1.22%	8.36%	2.23%	1.48%
12_11-20	3.68%	5.22%	1.93%	1.85%	2.06%	9.59%	2.16%	1.97%
12_21-31	4.36%	5.80%	5.83%	3.80%	4.41%	14.09%	6.73%	5.31%
01_01-10	7.15%	8.94%	6.99%	3.25%	4.52%	14.23%	5.87%	4.03%
01_11-20	4.75%	4.45%	4.18%	3.00%	3.75%	8.78%	3.07%	3.14%
01_21-31	3.03%	3.74%	5.21%	3.25%	5.05%	7.53%	4.09%	4.07%
02_01-10	5.32%	2.72%	3.91%	2.94%	6.84%	5.77%	2.39%	2.07%
02_11-20	3.66%	2.50%	3.53%	3.58%	4.64%	6.00%	2.54%	2.19%
02_21-28	4.59%	3.12%	2.38%	3.48%	5.56%	4.48%	3.63%	2.95%
03_01-10	3.25%	2.78%	3.12%	4.09%	5.78%	3.87%	1.94%	2.83%
03_11-20	2.74%	2.74%	3.22%	4.58%	4.92%	3.74%	4.00%	3.09%
03_21-31	2.60%	2.60%	3.76%	5.83%	4.82%	3.83%	3.88%	4.28%
04_01-10				6.60%		3.49%		3.12%
04_11-20				6.60%				4.64%
04_21-30				6.85%				6.74%

2019年度 ノロウイルス陽性率は 2011年と同程度の推移

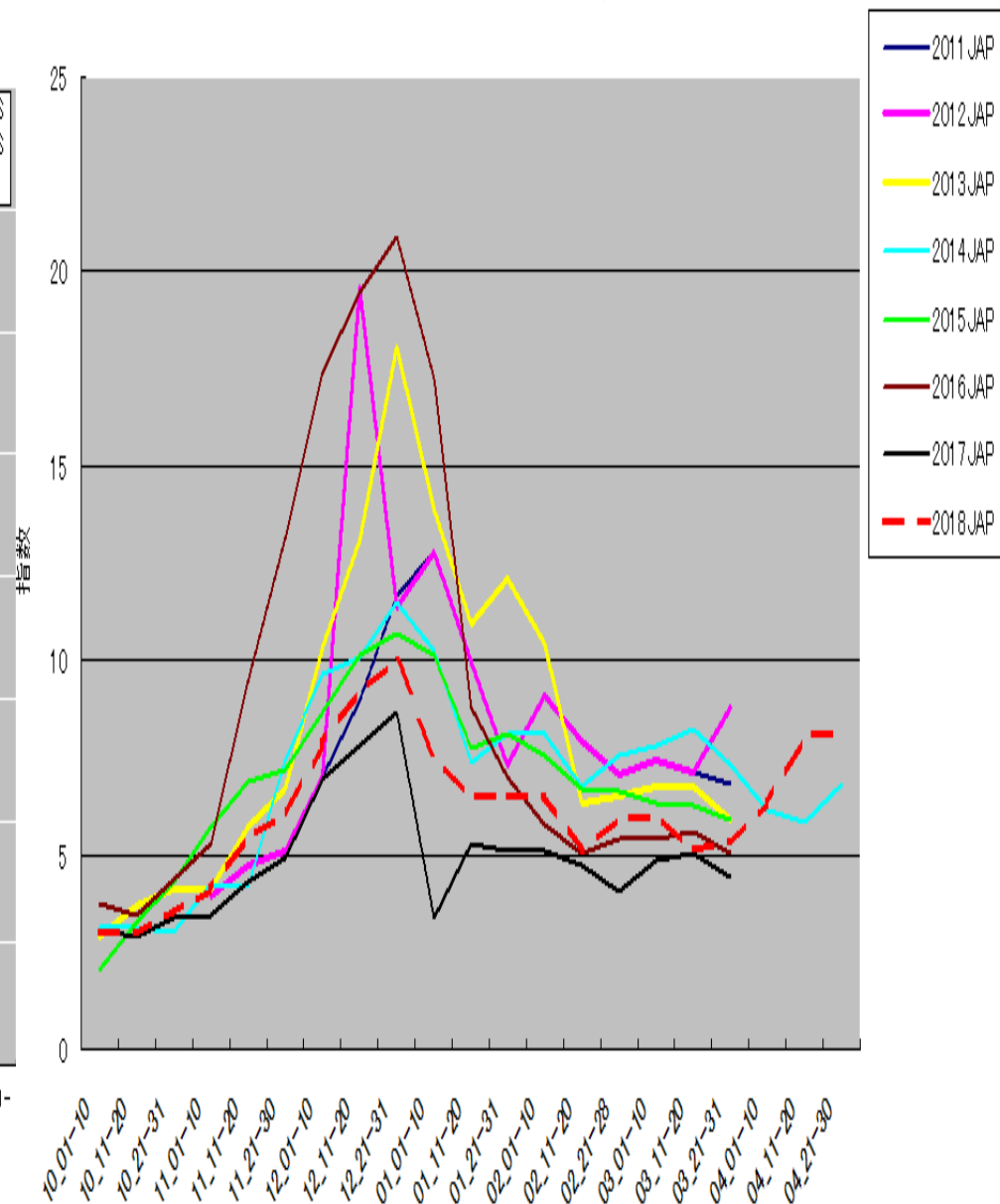


過去8年間のBMLフード・サイエンスで検査した ノロウイルス陽性率

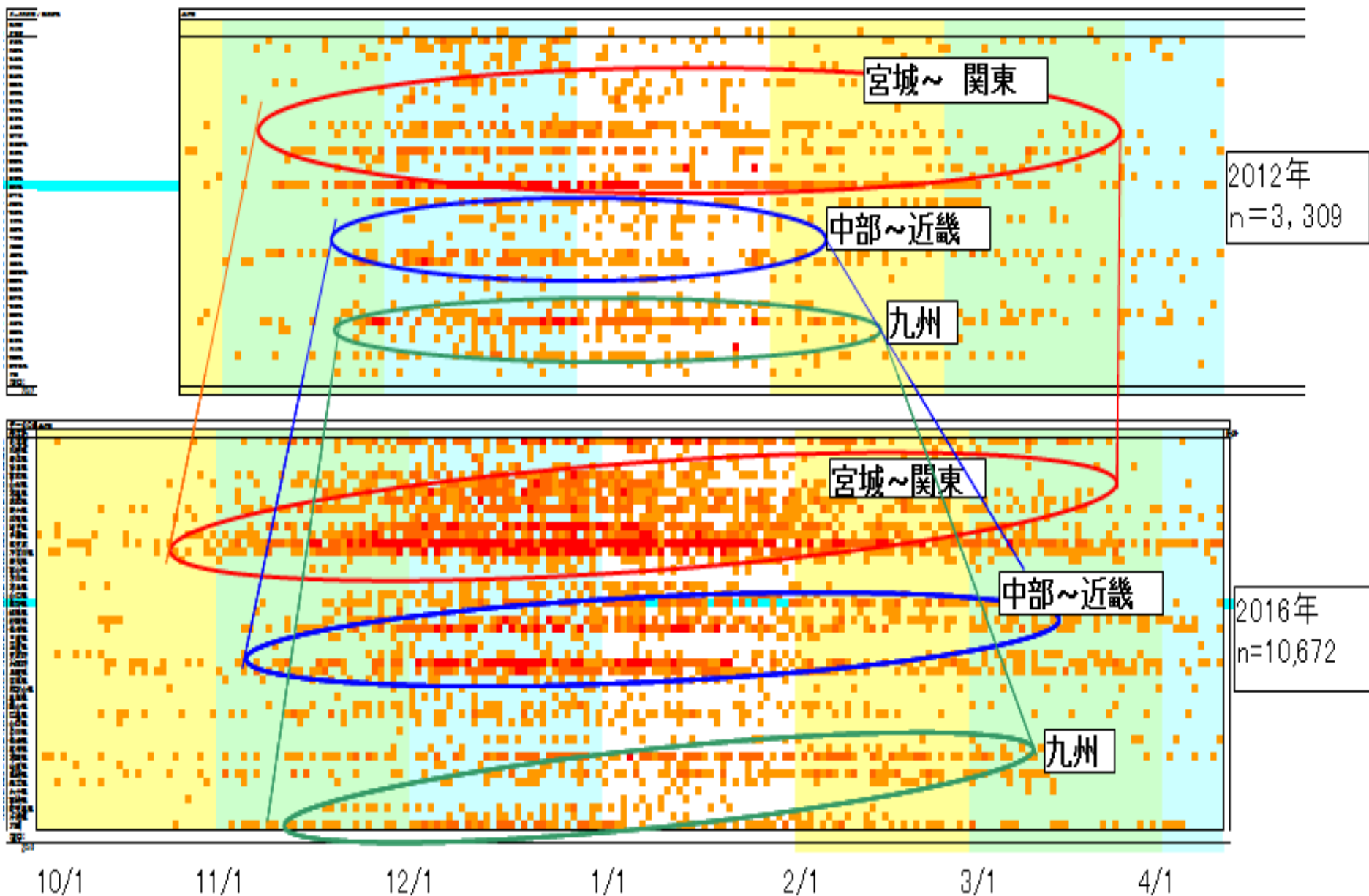


ほぼ平行に動く

厚生労働省ノロウイルス感染指数(同期間)



2012年/2016年から見る わが国のノロウイルス流行地域の傾向



シーズンに見られる陽性率・健康保菌者率

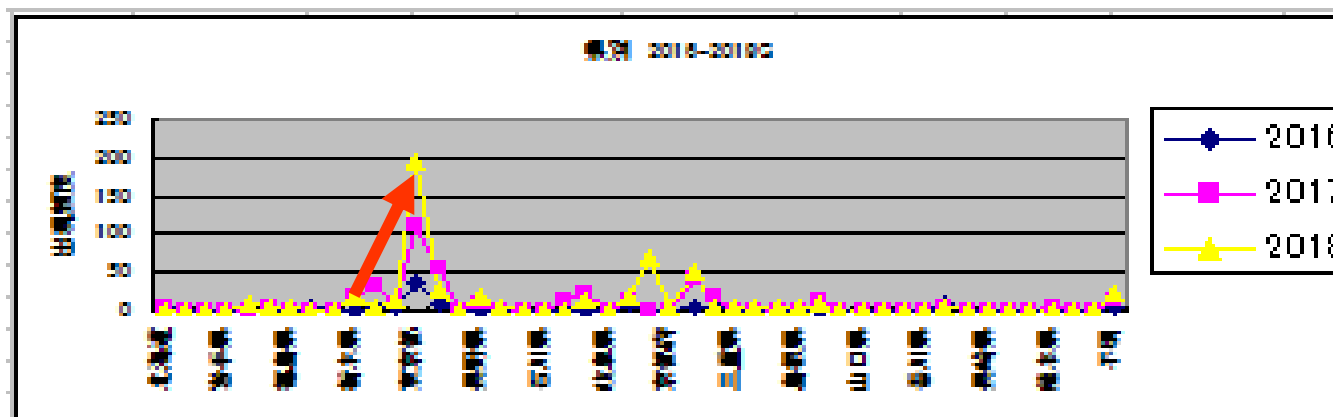
2016年度 スクリーニング施設の陽性率					
	RT-PCR				
得意先名	(－)	(＋)	陽性率	実施時期	総計
企業A社(ホテル)	116	5	4.13%	11月中旬	121
企業B社(ホテル)	1,992	35	1.76%	11月中旬	2,030
企業C社(ホテル)	507	11	2.17%	11月中旬	522
企業D社(ホテル)	882	35	3.97%	11月中旬	918
企業E社(外食)	5,271	71	1.35%	12月末、1月中旬	5,348
企業F社(外食)	1,028	29	2.82%	1月初め	1,058
企業G社(ブライダル)	2,043	23	1.13%	毎月実施	2,068
総計	11,839	209	1.77%		12,048

型別G1,G2の動き

2016-2018年

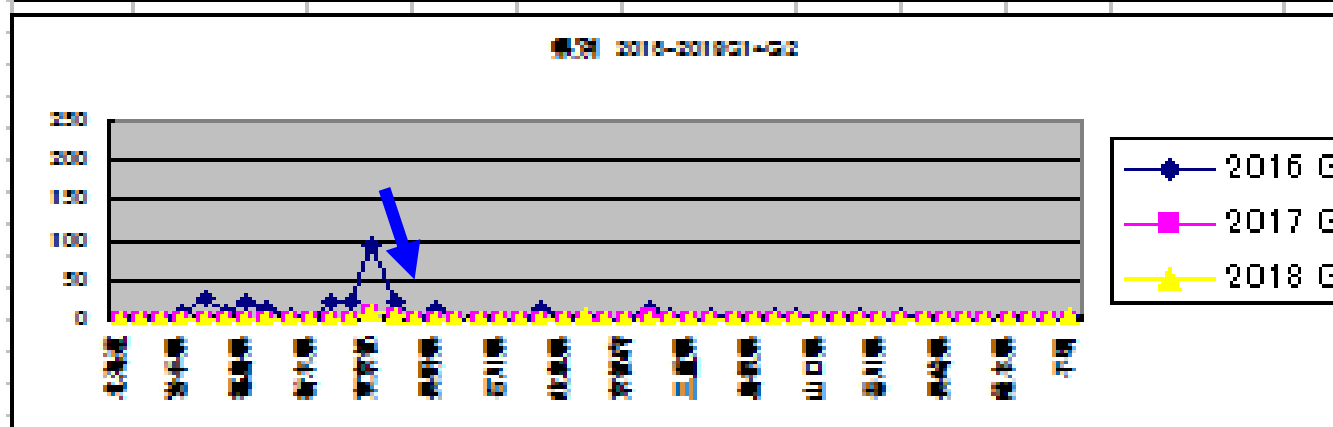
G1

増加傾向



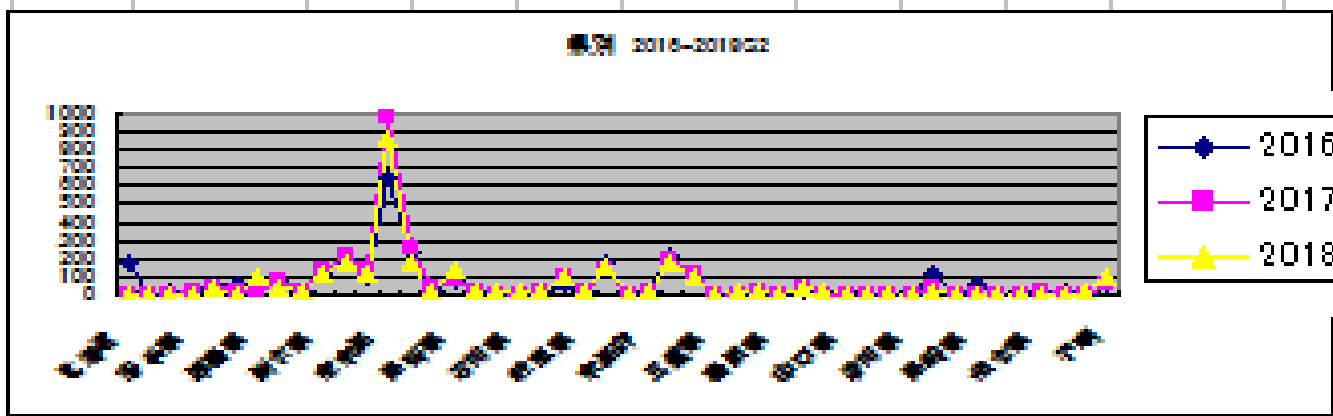
G1+G2

減少傾向



G2

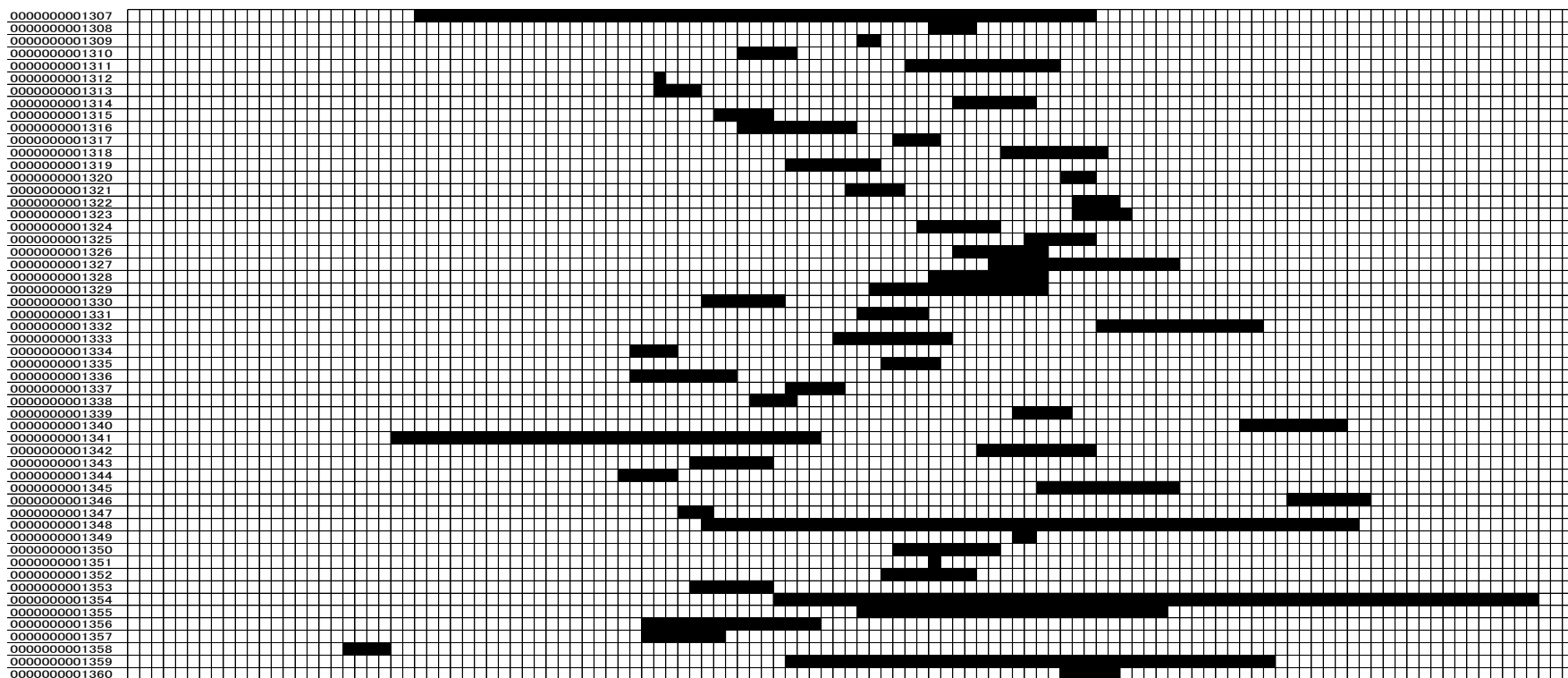
増減無し



排菌はどのくらい続くのか(2011-2013)

ノロウイルス排菌期間調査(11/1-/03/31)

2011年	陽性数	942例	複数回排菌者数	141例	平均排菌日数	7.07	最長排菌日数	34日
2012年	陽性数	3,008例	複数回排菌者数	509例	平均排菌日数	8.12	最長排菌日数	84日
2013年	陽性数	2,852例	複数回排菌者数	360例	平均排菌日数	8.06	最長排菌日数	64日



2011／11－2014／03 複数回感染はどの程度あるのか

陽性件数6,082 のべ陽性者数5,085名→複数回検査陽性者1,010名

期間中に複数年度に感染した例 73件

氏名	2011-	2012-	2013-	総計
●●ダ●ケ●ル	★	★		3
●●ダユ●ロ▲	★	★		3
●ナミリョ▲●	★	★		3
▲●●ラ●ヨエ	★	★		3
エンダ●●●シ	★	★		3
●●ダケン	★	★		3
●ク●ラユ▲●	★	★		3
●ノ●●●●●	★	★		3
●▲▲ミホ	★	★		3
●●ナ●ミ●●	★	★		3
●●●▲フミ◎	★		★	5
●●●リュ▲●	★		★	5
●●●フミ◎	★		★	5
クホ●▲ミ	★		★	5
◎ガ●▲●ル	★		★	5
●ス●ヨシ◎	★		★	5
●●●シ●●◎	★		★	5
●●●▲ナ●●	★		★	5
●●●▲クミ◎	★		★	5

21例

9例

氏名	2011-	2012-	2013-	総計
●ス●ユ▲●		★	★	6
●●シ●シュン●ケ		★	★	6
●●●シ●ス◎		★	★	6
●ナ●ヨシエ		★	★	6
▲ミ●リョ▲		★	★	6
ナ●ガ●シンゴ		★	★	6
ナ●●ラ●ル●		★	★	6
～				
●シ●▲●●●		★	★	6
●セカ●ミス●		★	★	6
ヒゲ●ユ●リ		★	★	6
ヒラ●シノリ◎		★	★	6
フク●●●●◎		★	★	6
●エダ●●▲		★	★	6
●●ミ●●●◎		★	★	6
●●●▲ナミ		★	★	6
●●●▲ヒロ◎		★	★	6
●●ダシ●リ		★	★	6
●●ナ●●●ヨ		★	★	6
●●ナ●メグミ		★	★	6
植◎結▲		★	★	6

43例

3年続けて陽性は無し

さらに2018年度まで調査 複数回感染例

調査期間では最多3回の感染事例が確認されたが
3年連続
無し

複数年排菌者

検査年次	依頼企業	地域	検査日	NO	受信者名	検査項目	G1	G2	G1+G2
2012	MS社	熊本県	2012/12/21	S903-0245	○マ●ラ●ヨウ●	ノロウイルスPCR	*	*	mix+
2014	MS社	熊本県	2015/1/30	S902-0502	○マ●ラ●ヨウ●	ノロウイルスPCR	*	*	mix+
2015	MS社	熊本県	2017/1/20	S902-0535	○マ●ラ●ヨウ●	ノロウイルスPCR	-	G2	G2
2016	MS社	熊本県	2017/1/25	S901-0526	○マ●ラ●ヨウ●	ノロウイルスPCR	-	G2	G2
2017	ME社	千葉県	2014/4/23	S903-0126	○ン●トウ●	ノロウイルスPCR	*	*	mix+
2018	ME社	千葉県	2014/4/26	S903-0114	○ン●トウ●	ノロウイルスPCR	*	*	mix+
2019	ME社	千葉県	2014/4/28	S903-0111	○ン●トウ●	ノロウイルスPCR	*	*	mix+
	ME社	千葉県	2016/12/18	S914-0443	○ン●トウ●	ノロウイルス(強度)	G1	G2	G1+G2+
	ME社	千葉県	2016/12/24	S901-0411	○ン●トウ●	ノロウイルス(強度)	G1	G2	G1+G2+
	ME社	千葉県	2018/4/15	S901-0226	○ン●トウ●	ノロウイルス(強度)	G1	-	G1
	ME社	千葉県	2018/4/18	S901-0135	○ン●トウ●	ノロウイルス(強度)	G1	-	G1
	ME社	千葉県	2018/4/25	S901-0122	○ン●トウ●	ノロウイルス(強度)	G1	-	G1
	BB社	東京都	2017/1/9	S901-0723	●ヲ●ユン○チ	ノロウイルスPCR	-	G2	G2
	BB社	東京都	2017/1/11	S901-0622	●ヲ●ユン○チ	ノロウイルスPCR	-	G2	G2
	BB社	東京都	2017/1/12	S908-0124	●ヲ●ユン○チ	ノロウイルスPCR	-	G2	G2
	BB社	東京都	2018/1/4	S902-0201	●ヲ●ユン○チ	ノロウイルスPCR	-	G2	G2
	BB社	東京都	2019/1/4	S901-0302	●ヲ●ユン○チ	ノロウイルスPCR	-	G2	G2
	BB社	東京都	2019/1/5	S901-0212	●ヲ●ユン○チ	ノロウイルスPCR	-	G2	G2
	BB社	東京都	2019/1/6	S901-0101	●ヲ●ユン○チ	ノロウイルスPCR	-	G2	G2
	BB社	東京都	2019/1/7		●ヲ●ユン○チ	ノロウイルスPCR	-	G2	G2
	CM社	神奈川県	2014/4/14	S903-0126	ゲ●ー●エ●ー	ノロウイルスPCR	*	*	mix+
	CM社	神奈川県	2016/12/20	S902-0726	ゲ●ー●エ●ー	ノロウイルスPCR	-	G2	G2
	CM社	神奈川県	2016/12/27	S901-0537	ゲ●ー●エ●ー	ノロウイルスPCR	-	G2	G2
	CM社	神奈川県	2018/1/12	S902-1004	ゲ●ー●エ●ー	ノロウイルスPCR	G1	-	G1
	CM社	神奈川県	2018/1/15	S902-0734	ゲ●ー●エ●ー	ノロウイルスPCR	G1	-	G1
	ME社	長野県	2014/12/20	S902-0410	ヨ●トモ○	ノロウイルスPCR	*	*	mix+
	ME社	長野県	2015/1/1	S902-0222	ヨ●トモ○	ノロウイルスPCR	*	*	mix+
	ME社	長野県	2017/1/4	S902-0528	ヨ●トモ○	ノロウイルス(強度)	-	G2	G2
	ME社	長野県	2017/1/11	S901-0746	ヨ●トモ○	ノロウイルス(強度)	-	G2	G2
	ME社	長野県	2017/1/17	S902-0117	ヨ●トモ○	ノロウイルス(強度)	-	G2	G2
	ME社	長野県	2018/12/30	S901-0110	ヨ●トモ○	ノロウイルス(強度)	G1	-	G1
	ME社	長野県	2019/1/6	S902-0204	ヨ●トモ○	ノロウイルス(強度)	G1	-	G1

ボランティアによるノロウイルス感染実験

被検者	第1回目投与	第2回目投与 (2～3年後)	第3回目投与 (1～2ヶ月後)
A	●	●	●
B	●	●	×
C	●	●	×
D	●	●	×
E	●	●	×
F	●	●	×
G	×	×	—
H	×	×	—
I	×	×	—
J	×	×	—
K	×	×	—
L	×	×	—

2、3年免疫は持続しない

数ヶ月 年免疫は持続する

二年連続して感染→ブースター効果

●:発症

×:非発症

最少感染ウイルス量は100個以下

ノロウイルスとヒト血液型抗原 抗原との結合性

現在では、血液型と相関のない変異遺伝子型も添え化している

非分泌

Norwalk	G I -1	+	-	+	-
Hawaii	G II -1	-	-	-	-
Snow Mountain	G II -2	-	+	-	-
Mexico	G II -3	+	+	-	-
GrV	G II -4	+	+	+	-
VA207	G II -9	-	-	+	+

適切な検査間隔はどのくらいでしょうか

企業名	所在地	判定日	検体番号	氏名	項目名1	G1	G2	G1
I社	北海道	2016/2/26	S790-0550	イ ● サ シ	ノロウイルスPCR			mix+
I社	北海道	2016/2/29	S790-0101	イ ● サ シ	ノロウイルスPCR			mix+
I社	北海道	2017/2/7	S792-0102	イ ● サ シ	ノロウイルスPCR -		G2	G2
I社	北海道	2017/2/8	S793-0101	イ ● サ シ	ノロウイルスPCR -		G2	G2
I社	北海道	2017/2/9	S794-0114	イ ● サ シ	ノロウイルスPCR -		G2	G2
I社	北海道	2017/2/10	S795-0202	イ ● サ シ	ノロウイルスPCR -		G2	G2
I社	北海道	2017/2/13	S791-0104	イ ● サ シ	ノロウイルスPCR -		G2	G2
I社	北海道	2017/2/14	S792-0110	イ ● サ シ	ノロウイルスPCR -		G2	G2
I社	北海道	2017/2/15	S7					G2
I社	北海道	2017/2/16	S7					G2
I社	北海道	2017/2/17	S7					G2
I社	北海道	2017/2/18	S796-0135	イ ● サ シ	ノロウイルスPCR -		G2	G2
I社	北海道	2017/2/20	S791-0103	イ ● サ シ	ノロウイルスPCR -		G2	G2
I社	北海道	2017/2/21	S792-0204	イ ● サ シ	ノロウイルスPCR -		G2	G2
I社	北海道	2017/2/22	S793-0203	イ ● サ シ	ノロウイルスPCR -		G2	G2
I社	北海道	2017/2/23	S794-0233	イ ● サ シ	ノロウイルスPCR -		G2	G2
I社	北海道	2017/2/24	S795-0101	イ ● サ シ	ノロウイルスPCR -		G2	G2
I社	北海道	2017/2/25	S796-0101	イ ● サ シ	ノロウイルスPCR -		G2	G2

毎日 は 間隔 が 短すぎる

M社	神奈川県	2017/12/10	S902-0418	イ ウ キ	ノロウイルスPCR -		G2	G2
M社	神奈川県	2017/12/12	S902-0236	イ ウ キ	ノロウイルスPCR -		G2	G2
M社	神奈川県	2017/12/13	S901-0435	イ ウ キ	ノロウイルスPCR -		G2	G2
M社	神奈川県	2017/12/14	S901-0825	イ ウ キ	ノロウイルスPCR -		G2	G2
M社	神奈川県	2017/12/15	S902-0713	イ ウ キ	ノロウイルスPCR -		G2	G2
M社	神奈川県	2017/12/16	S902-0226	イ ウ キ	ノロウイルスPCR -		G2	G2
M社	神奈川県	2017/12/17	S					G2
M社	神奈川県	2017/12/18	S					G2
M社	神奈川県	2017/12/20	S					G2
M社	神奈川県	2017/12/24	S901-0141	イ ウ キ	ノロウイルスPCR -		G2	G2
M社	神奈川県	2017/12/25	S902-0102	イ ウ キ	ノロウイルスPCR -		G2	G2
M社	神奈川県	2017/12/26	S902-0347	イ ウ キ	ノロウイルスPCR -		G2	G2
M社	神奈川県	2018/1/1	S901-0208	イ ウ キ	ノロウイルスPCR -		G2	G2
M社	神奈川県	2018/1/2	S901-0130	イ ウ キ	ノロウイルスPCR -		G2	G2
M社	神奈川県	2018/1/3	S901-0141	イ ウ キ	ノロウイルスPCR -		G2	G2

毎日 は 間隔 が 短すぎる

適切な検査間隔はどのくらいでしょうか

ノロウイルス排菌期間調査(11/1-/03/31)

2011年	平均排菌日数7.07	最長排菌日数	34日
2012年	平均排菌日数8.12	最長排菌日数	84日
2013年	平均排菌日数8.06	最長排菌日数	64日

排菌は7日程度は続く

健康保菌者であれば検査間隔は7日に一度が望ましい
有症者の次回検査は7日後、その後は体調に合わせて

従業員を早く職場復帰させたい気持ちもわかるが、科学的に検査が経済的
ただし、従業員の健康管理を積極的に実施する施設の陽性率は低い傾向にある

排菌(ウイルス) 長期間の排菌が確認される例

異遺伝子型混合感染

(株)メ●●千葉県	2016/11/23	S901-0208	ヤ	チ	カ	ノロウイルス(強度-	G2	G2
(株)メ●●千葉県	2016/11/28	S901-0142	ヤ	チ	カ	ノロウイルス(強度-	G2	G2
(株)メ●●千葉県	2016/12/1	S901-0603	ヤ	チ	カ	ノロウイルス(強度-	G2	G2
(株)メ●●千葉県	2016/12/4	S902-0307	1ヶ月			ノロウイルス(強度-	G2	G2
(株)メ●●千葉県	2016/12/7	S901-0620	ヤ	チ	カ	ノロウイルス(強度-	G2	G2
(株)メ●●千葉県	2016/12/19	S914-0529	ヤ	チ	カ	ノロウイルス(強度G1	G2	G1+G2+
(株)メ●●千葉県	2016/12/26	S902-0608	ヤ	チ	カ	ノロウイルス(強度G1	G2	G1+G2+
星△●社 長野県	2018/11/8	S902-0416	ABC			ノロウイルスPCR G1	-	G1
星△●社 長野県	2018/11/11	S901-1104	ABC			ノロウイルスPCR G1	-	G1
星△●社 長野県	2018/11/13	S901-0223	3ヶ月			ノロウイルスPCR G1	-	G1
星△●社 長野県	2018/12/10	S902-0747	ABC			ノロウイルスPCR -	G2	G2
星△●社 長野県	2019/1/30	S901-0936	ABC			ノロウイルスPCR -	G2	G2

ノロウイルスの流行の見極め

- G II 4の新亜種出現が引き金になる
- BFSの陽性率が11/20-30 3-4.0を超える
- 厚生省感染指数12月はじめに10.0を超える

検査結果解析からのまとめ

- 全国から10-4月に10万件以上検査する弊社のような大規模検査施設のNV陽性率は、厚生労働省の感染性胃腸炎・ノロウイルス情報と良く相関する。
 - 陽性が確認されたNV保有の期間は、平均7-8日程度、長期保存者では80-90日間も確認された。
 - スクリーニング検査では業界による顕著な差は認められない。2012、2016流行期でも2-3%。地域間の特徴として 関東～宮城、中部～近畿、九州に同時期流行の傾向が認められた。
 - 2016年以降、G1が増加傾向で、特に人口密集の東京都が顕著
 - 食品従事者にもここ十年のうち、複数回感染者が確認された
- NVに感染すると数ヶ月の免疫獲得が報告されているが、翌シーズンにも感染していることから、獲得免疫は6ヶ月程度と考えられる。2連続シーズンNV感染すると免疫はブースター効果がみられ、3連続シーズンNV感染は認められなかった。
- 大量調理施設管理マニュアル、HACCP制度化がスタートしており、従業員の衛生管理は個人の問題から事業者の責任へと移行した。検査は必要に応じて行うためには、適切な検査期間(はじめは7日後)が妥当と思われる。