

〈原 著〉

## 大量調理施設衛生管理マニュアルに基づいたノロウイルス検査法 4 法の比較

荻原 真二<sup>1,2,3)</sup>・井上 修<sup>2)</sup>・荘司 智和<sup>2)</sup>・窪川 佳世<sup>2)</sup>  
 松村 大樹<sup>2)</sup>・矢崎 正浩<sup>2)</sup>・井上 克枝<sup>1,3)</sup>

*Multiple Comparisons of Four Methods for Norovirus Detection Based on the  
 “Sanitary Management Manual for Large Cooking Facilities”  
 by the Ministry of Health, Labor and Welfare in Japan*

Shinji OGIHARA<sup>1,2,3)</sup>, Osamu INOUE<sup>2)</sup>, Tomokazu SHOJI<sup>2)</sup>, Kayo KUBOKAWA<sup>2)</sup>,  
 Hiroki MATSUMURA<sup>2)</sup>, Masahiro YAZAKI<sup>2)</sup> and Katsue INOUE-SUZUKI<sup>1,3)</sup>

<sup>1)</sup>Central Laboratory Unit, University of Yamanashi Hospital,

<sup>2)</sup>Division of Infection Control and Prevention, University of Yamanashi Hospital,

<sup>3)</sup>Department of Clinical and Laboratory Medicine, Faculty of Medicine, University of Yamanashi

(2018年6月11日受付・2018年11月22日受理)

## 要 旨

平成 29 年 6 月に大量調理施設衛生管理マニュアルの改正が通達され、ノロウイルスの流行期間の 10 月～3 月までの間、大量調理施設の調理者を対象に高感度検査法でノロウイルス検査を行うことと記載されている。そこで現在国内で実施可能なノロウイルス検査法 4 法について感度、検査実働時間、トータル検査時間、コストについて比較分析した。

健康人ボランティアより提出された 53 名の便検体（陽性例の追跡検査分を含む 62 検体）を用い GeneXpert システム、TaKaRa ノロウイルスキット、TaqMan Probe 法、クイックナビーノロ 2 の 4 法について検討した。

GeneXpert システム、TaKaRa ノロウイルスキット、TaqMan Probe 法の 3 法は、大量調理施設衛生管理マニュアルが求める感度の検査法であった。53 名の便検体の検査実働時間は各々 106 分、260 分、687 分、76 分、トータル検査時間は各々 2,434 分、320 分、857 分、91 分、コストは各々 202,089 円、73,644.4 円、152,249 円、79,500 円であった。

本検討より我々が理想的と考える検査法の選択は、大量検体を処理するスクリーニング検査法は TaKaRa ノロウイルスキット、さらに陽性者の追跡調査は GeneXpert システムの組み合わせである。検査法にはそれぞれ特徴があり、それらを理解した上で検査法を使い分けることが肝要である。

Key words : ノロウイルス, 大量調理施設, 高感度検査, 検査コスト, PCR

## 序 文

平成 29 年 6 月 16 日に厚生労働省より大量調理施設衛生管理マニュアルの改正が通達された<sup>1)</sup>。大量調理施設衛生管理マニュアルは、「10 月から 3 月までの間には月に 1 回以上又は必要に応じてノロウイルスの検便検査に努めること。」、さらに検査法として「概ね便 1 g 当たり

10<sup>5</sup>オーダーのノロウイルスを検出できる検査法を用いることが望ましい。」と記載されており、ノロウイルスに関する感染防止及び衛生管理を重視した内容となっている。そのため、同一メニューを 1 回 300 食以上又は 1 日 750 食以上を提供する病院などの大量調理施設ではノロウイルスを高感度に検出できる検査体制を保有してゆく必要がある。

ノロウイルスは、ウイルス性胃腸炎の原因ウイルスの一つであり、冬季に流行をする<sup>2)</sup>。ノロウイルス感染症

<sup>1)</sup>山梨大学医学部附属病院検査部, <sup>2)</sup>山梨大学医学部附属病院感染制御部, <sup>3)</sup>山梨大学大学院総合研究部医学域臨床検査医学講座

表1 各検査法の特徴

検査法	GeneXpert システム	TaKaRa ノロウイルスキット	TaqMan Probe 法	クイックナビ
原理	Real-Time PCR 法	Real-Time PCR 法	Real-Time PCR 法	イムノクロマト法
反応時間	90分	60分	60分	15分
長所	・操作が簡便 ・結果判定が容易 ・自動化されている	・多くのサンプル数に適する	・多くのサンプル数に適する ・厚生労働省が推奨	・操作が簡便 ・安価
短所	・特別な装置が必要 ・キットが高価	・特別な装置が必要 ・ピペット操作を要する	・特別な装置が必要 ・ピペット操作を要する	・低感度 <sup>7)</sup>

表2 ノロウイルス検出システム4種による糞便53検体からのノロウイルス検出の比較

サンプル	GeneXpert システム	TaKaRa ノロウイルスキット	TaqMan Probe 法
陽性コントロール*	陽性	陽性	陽性
糞便検体 (n=53)	3	1	0

\*GI, GII: 1-2×10<sup>4</sup> copy/μL.  
表中の数字は陽性検体数を示す。

は、ウイルスで汚染された食品を喫食することで感染が拡大するため、大量調理施設である病院では集団感染の発生に警戒する必要がある<sup>3)</sup>。ノロウイルスは、10<sup>2</sup>-10<sup>3</sup>のウイルス粒子でも感染が成立するなど感染性が高く、しばしば大規模な集団感染を引き起こす<sup>4)</sup>。ノロウイルスによる食中毒では、調理者を介したアウトブレイク事例も報告されている<sup>5)</sup>。さらにノロウイルスの不顕性感染者は便中に感染者と同程度のウイルス粒子が存在している<sup>6)</sup>。そのため、ノロウイルスを迅速かつ高感度に検出する検査法は、診断や治療のみではなく感染制御にも大きな意義を持つ。

現在、ノロウイルス検査法には複数の方法があり、方法や原理により感度と特異度が異なる<sup>7,8)</sup>。多数のノロウイルス検査法が存在するが、これらの検査法の特徴を比較した報告は少なく、特に遺伝子検査法を複数比較した論文は存在しない。そこで我々は現在国内の主なノロウイルス検査法4法を様々な視点で比較検討し、その特徴を明らかにした。

材料と方法

サンプルは、2016年10月から2017年3月までに提出され、-80℃に凍結保存されていた健康人ボランティア53名(陽性例の追跡検査分を含む62検体)の糞便を用いた。凍結検体を室温で溶解後、各検査法を同時に実施した。ノロウイルス検査法は、遺伝子検査法としてGeneXpert システム GX-II Xpert<sup>®</sup> Norovirus (以下; GeneXpert システム) (セフィエド合同会社)、TaKaRa ノロウイルス GI/GII 検出キット (以下; TaKaRa ノロウイルスキット) (タカラバイオ株式会社)、厚生労働省が推奨する TaqMan Probe 法 (以下; TaqMan Probe 法) の3法を用いた。さらにイムノクロマト法としてク

イックナビーノロ2 (以下; クイックナビ) (デンカ生研株式会社) を用いて、全4法を検討した。各方法は添付文書または厚生労働省が推奨している方法に準じて実施した。TaKaRa ノロウイルスキットと TaqMan Probe 法で使用するリアルタイム PCR 装置は Applied Biosystems<sup>®</sup> 7500 Fast Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific 株式会社) を使用した。各方法の特徴は表1に示す。陽性コントロールは遺伝子検査法である GeneXpert システム、TaKaRa ノロウイルスキット、TaqMan Probe 法で実施した。陽性コントロールの調整方法は各方法で陰性と確認された便検体を使用し、便検体1gにノロウイルス GI・GII の既知濃度1~2×10<sup>4</sup> copy/μL を1μL 添加、混和し各方法を実施した。

検討項目は、検出感度、検査実務時間、トータル検査時間、検査コストとした。陽性と判定された被検者では1週間毎に便検体が提出されており、陰性化するまでの期間も検討した。検査実働時間は、試薬分注、チューブの準備、遠心機への装填の操作時間、判定時間など実際の操作時間とした。トータル検査時間は、検査実働時間に遠心時間、反応時間を含めたものとした。

陽性と判定された被検者の追加検査および陽性コントロールは検査実務時間、トータル検査時間、検査コストから除外した。

本研究は山梨大学医学部倫理委員会(病原体等安全管理委員会を含む)の承認(承認番号1686)を得て行った。

結 果

53名の糞便検体中、GeneXpert システムで3名の便検体が陽性となり、うち1名の便検体は TaKaRa ノロウイルスキットでも陽性となった(表2)。TaqMan

表 3 陽性検体の追跡結果

検査法	GeneXpert システム			TaKaRa ノロウイルスキット		
	陽性検体	No. 1	No. 2	No. 3	No. 1	No. 2
初回検査日	検出	検出	検出	検出	未検出	未検出
1 週目	検出	検出	検出	検出	未検出	未検出
2 週目	検出	検出	未検出	未検出	未検出	未検出
3 週目	未検出	未検出	未検出	未検出	未検出	未検出

表 4 53 名分便検体の検査実働時間, トータル検査時間, 検査コスト

検査法	GeneXpert システム	TaKaRa ノロウイルスキット	TaqMan Probe 法	クイックナビ
検査実働時間	106 分	260 分	687 分	76 分
トータル検査時間	2,434 分	320 分	857 分	91 分
検査コスト	202,089 円	73,644.4 円	152,249 円	79,500 円

Probe 法とクイックナビは 53 名の糞便検体全てが陰性となった。陽性コントロールは GeneXpert システム, TaKaRa ノロウイルスキット, TaqMan Probe 法すべての方法で GI・GII とともに陽性を示した。GeneXpert システムで陽性となった 3 名の便検体は, 1 名の便検体が 2 週目で陰性, 2 名の便検体が 3 週目で陰性となった。TaKaRa ノロウイルスキットで陽性となった 1 名の便検体は 2 週目で陰性となった (表 3)。53 名の便検体の検査にかかった検査実務時間, トータル検査時間, 検査コストは表 4 に示す。GeneXpert システム, TaKaRa ノロウイルスキット, TaqMan Probe 法, クイックナビの順に, 検査実務時間は 106 分, 260 分, 687 分, 76 分であった。以下同様にトータル検査時間は 2,434 分, 320 分, 857 分, 91 分, 検査コストは 202,089 円, 73,644.4 円, 152,249 円, 79,500 円であった。

考 察

本研究では大量調理施設の調理者を想定し, 多くのサンプル数で検討を行い, 検出感度, 業務的負担や経済的負担の指標として検査実務時間, トータル検査時間, 検査コストを比較した。検出感度は GeneXpert システムが最も高く, 次いで TaKaRa ノロウイルスキットであった。GeneXpert システムで陽性判定となった 3 名の便検体, そのうち 1 名の便検体は TaKaRa ノロウイルスキットでも陽性を示し, 両方法で 2 週から 3 週に渡りウイルスの排出が確認された。さらに, 両者は Probe 法を原理としているため特異度が非常に高いことも考慮すると GeneXpert システムと TaKaRa ノロウイルスキットの陽性結果は偽陽性ではなく真の陽性判定であったと考える。左近の報告では, TaKaRa ノロウイルスキットと厚生労働省が推奨する方法で実施した TaqMan Probe 法の比較検討を行い, TaKaRa ノロウイルスキッ

トがより高感度にノロウイルスを検出しており, その検出感度は 10~100 copy であった<sup>9)</sup>。本研究の厚生労働省が推奨する方法で実施した TaqMan Probe 法は, 測定した検体では全て陰性であったが陽性コントロールである 1~2×10<sup>4</sup> copy/g では検出可能であった。林らの報告でも, 厚生労働省が推奨する方法で実施した TaqMan Probe 法の検出限界は, 2.1×10<sup>4</sup> copy/g 糞便と評価している<sup>10)</sup>。これらの結果から GeneXpert システム, TaKaRa ノロウイルスキット, TaqMan Probe 法の 3 法は, 大量調理施設衛生管理マニュアルが求める感度の検査法であった。一方, 技術発展に伴い少数のウイルス粒子まで検出できる検査法も開発されるようになった<sup>9)</sup>。便 1 g 当たり 10<sup>5</sup> オーダーの検査法の実施によるアウトブレイクの抑制効果の報告はなく, またノロウイルスは 10<sup>2</sup>-10<sup>3</sup> のウイルス粒子でも感染が成立することから, 大量調理施設衛生管理マニュアルにおける検出感度の適正については今後の検討課題と考える。特に易感染者が多数入院している病院などの大量調理施設では, 検査技術の向上に合わせたより高感度な検査法でノロウイルスを検出することで, これまで以上に食の安全を保障することが可能になると考える。

検査および結果判定にかかる時間を計測した検査実務時間は, クイックナビが最も短く, 次いで GeneXpert システムであり, TaKaRa ノロウイルスキット, TaqMan Probe 法の順となった。クイックナビと GeneXpert システムは便を希釈液に懸濁し検査キットに前処理液を分注するのみであるため, 短時間で検査可能である。一方で, TaKaRa ノロウイルスキットと TaqMan Probe 法はバッチ方式であるため多くの検体を一度に検査可能であることが利点である。しかし TaqMan Probe 法は検査実務時間のみで 10 時間以上を要した。チューブの準備や分注, 遠心操作が複数回必要となるなど検査工程が

多岐にわたるためであり、検査実務時間の長さがその他の業務に影響を及ぼす可能性はある。感染者の勤務再開のためには、糞便中のノロウイルスが陰性化したことを確認する必要があるが、GeneXpert システムと TaKaRa ノロウイルスキットでは北川らの報告<sup>7)</sup>と同様に2週から3週に渡りウイルスの排出が確認された。この間は定期的にPCR法での検査を繰り返す必要があり、TaKaRa ノロウイルスキットでの検査実務時間と比べGeneXpert システムの検査実務時間は短く、検査者の負担を減らすことに繋がる。

一方で、トータル検査時間の検討では、クイックナビが最も短く、次いでTaKaRa ノロウイルスキットであった。最も長かった検査法はGeneXpert システムの2,434時間であった。

検査コストは、チップ等含めた消耗品と試薬及び検査キットを足し合わせたものであり、装置費用や人件費は含めていない。最も安価であった検査法はTaKaRa ノロウイルスキット、次いでクイックナビであった。最も高価であった検査法はGeneXpert システムであった。装置費用は、GeneXpert システム GX-II が4,250,000円、TaKaRa ノロウイルスキット、TaqMan Probe法で使用したApplied Biosystems<sup>®</sup> 7500 Fast Real-Time PCR System が8,500,000円であった。

今回の研究では、無症状の健康人ボランティアを対象にしたにも関わらず、ノロウイルスの陽性者が発見され、継続的にウイルス粒子の排出が見られた。このような不顕性感染者が大量調理施設内にウイルスを持ち込み、食事を介した集団食中毒の原因となる可能性があることが改めて示された。このような事態を可能な限り回避するために、大量調理施設における調理者を対象としたスクリーニング検査では、高感度かつ検査者の業務負担の少ない検査法が理想的である。大量調理施設衛生管理マニュアルが求める感度は、遺伝検査法または今回検討に含めなかった生物発酵酵素免疫測定法(BLEIA法)の感度が求められる。本検討より我々が理想的と考える検査法の選択は、①大量検体を処理するスクリーニング検査法はバッチ方式のTaKaRa ノロウイルスキット、②陽性者の追跡調査は短時間、低労力かつ高感度にノロウイルスを検出するGeneXpert システムの組み合わせで

ある。しかし、各施設で設備、人員配置、予算などそれぞれ異なることから、流行期の調理師ノロウイルス検査体制は大量調理施設衛生管理マニュアルを踏まえた継続可能な各施設に適した検査法を構築し実施すべきである。

**謝 辞**：本研究で使用した試薬を一部提供していただいたセフィエド合同会社の田島久大様、バックマン・コールター株式会社の堂浦照也様に深謝申し上げます。また、ノロウイルスGI・GIIの陽性コントロールを分与していただいた山梨県衛生環境研究所の久田美子様、大沼正行様に深謝申し上げます。

**利益相反自己申告**：申告すべきものなし。

## 文 献

- 1) 厚生労働省：大量調理施設衛生管理マニュアル 平成29年6月16日付け生食発0616第1号：<http://www.mhlw.go.jp/file/06-Seisakujouhou-11130500-Shokuhinanzanbu/0000168026.pdf>：2018年6月11日現在
- 2) 西尾 治, 秋山美穂, 愛木智香子, 杉枝正明, 福田伸治, 西田知子, 他：ノロウイルスによる食中毒について. 食品衛生学雑誌 2005; 46: 235-45.
- 3) 大西 司, 足立 満：教育病院におけるノロウイルス胃腸炎アウトブレイクへの対応. 感染症学雑誌 2007; 81(6): 689-94.
- 4) Teunis PF, Moe CL, Liu P, Miller SE, Lindesmith L, Baric RS, *et al.*: Norwalk virus: how infectious is it? J Med Virol 2008; 80: 1468-76.
- 5) 田代隆良, 浦田秀子：ノロウイルス感染症と集団感染対策. 保健学研究 2008; 20(2): 1-8.
- 6) Ozawa KI, Oka T, Takeda N, Hansman GS: Norovirus infections in symptomatic and asymptomatic food handlers in Japan. J Clin Microbiol 2007; 45: 3996-4005.
- 7) 北川誠子, 藤井哲英, 二宮洋子, 河口 豊, 平田早苗, 東田志乃, 他：病院調理従事者におけるノロウイルス対策—迅速抗原検査とリアルタイムPCR検査の比較—. 環境感染誌 2015; 30(6): 418-21.
- 8) 山崎 勉, 由井郁子, 森島直哉, 黒木春郎：金コロイドを用いた新規イムノクロマト法による便中ノロウイルス検出試薬の有用性. 感染症学雑誌 2013; 87(1): 27-32.
- 9) 左近直美：核酸精製を必要としないone-stepリアルタイムPCRによるノロウイルス検査の有用性. 日本食品微生物学会雑誌 2017; 34(2): 135-9.
- 10) 林 志直, 秋場哲哉, 森 功次：東京都内における非発症調理従事者のノロウイルス排泄期間. 日本食品微生物学会雑誌 2012; 29(2): 108-13.

**〔連絡先〕** 〒409-3898 山梨県中央市下河東1110  
山梨大学医学部附属病院検査部 荻原真二  
E-mail: ogiharas@yamanashi.ac.jp

***Multiple Comparisons of Four Methods for Norovirus Detection Based on the  
“Sanitary Management Manual for Large Cooking Facilities”  
by the Ministry of Health, Labor and Welfare in Japan***

Shinji OGIHARA<sup>1,2,3</sup>, Osamu INOUE<sup>2</sup>, Tomokazu SHOJI<sup>2</sup>, Kayo KUBOKAWA<sup>2</sup>,  
Hiroki MATSUMURA<sup>2</sup>, Masahiro YAZAKI<sup>2</sup> and Katsue INOUE-SUZUKI<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>*Central Laboratory Unit, University of Yamanashi Hospital,*

<sup>2</sup>*Division of Infection Control and Prevention, University of Yamanashi Hospital,*

<sup>3</sup>*Department of Clinical and Laboratory Medicine, Faculty of Medicine, University of Yamanashi*

**Abstract**

The Sanitary Management Manual for Central Kitchens legislated by the Japanese Ministry of Health, Labor and Welfare was revised on June 16, 2017. Based on the revised manual, employees in central kitchens need to undergo Norovirus testing with high sensitivity every month from October to March, which is when Norovirus outbreaks occur. In the present study, we investigated the differences among 4 methods of Norovirus testing from the viewpoints of sensitivity, user time, total examination time, and running costs. All samples obtained from 53 healthy volunteers were tested for Norovirus using the GeneXpert<sup>®</sup> system, the TaKaRa Norovirus GI/GII testing Kit, the TaqMan Probe assay, and the Quick NaviTM-Noro2. Among them, the GeneXpert<sup>®</sup> system, TaKaRa Norovirus GI/GII testing Kit, and TaqMan Probe assay were all highly sensitive, at the level required by the “sanitary management manual for large cooking facilities.” The user working times of the GeneXpert, TakaRa, TaqMan, and Quick Navi testing methods for 53 samples were 106, 260, 687, and 76 min, respectively. The total examination times of the 4 were 2,434, 320, 857, and 91 min. The running costs of the 4 were 202,089, 73,644.4, 152,249, and 79,500 JPY, respectively. Based on these studies, we concluded that the TaKaRa Norovirus GI/GII testing Kit is suitable for the screen testing for Norovirus detection, and the GeneXpert<sup>®</sup> system for the follow-up testing of Norovirus-detected staff. We should understand the characteristics of the 4 methods and chose an appropriate one depending on the purpose.

---

**Key words:** Norovirus, central kitchen, highly sensitive method, running cost, PCR