

北九州市内で検出されたノロウイルスの遺伝子型について

北九州市保健環境研究所 ○木村 尚志

はじめに

本市では平成28年度から食中毒事例についてノロウイルスの遺伝子型別をはじめたところである。それ以前については実施例が無く、市内でどのような遺伝子型が流行していたのか不明であった。

今回過去数年にさかのぼって食中毒事例(疑いを含む)の検体及び感染症サーベイランスの検体についてノロウイルスの遺伝子型別を行ったので報告する。

試料と方法

試料は平成24年度から平成27年度までに感染症サーベイランスの感染性胃腸炎の検体として持ち込まれ、ノロウイルスが検出された糞便69検体及び平成25年度から27年度までに発生した食中毒事例のうちノロウイルスが検出された10事例21検体を用いた。

遺伝子型は基本的にVPI領域についてダイレクトシーケンス法により遺伝子配列を解析し、Norovirus Genotyping Toolにより決定した。系統樹はMEGA5を用い近接結合法により作成した。

結果と考察

感染症サーベイランスの検体からは10の遺伝子型が検出された(表1)。GIは種類、検出数とも少なく、ほとんどがGIIであった。最も多く検出された遺伝子型はGII.4で4年間に33検体であった。このうち23検体はSydney_2012に近縁で(図.1)毎年検出されている。また、Den Haag_2006bに近縁のものが平成24年度と平成26年度に検出されている。次に多かったのはGII.6であったが、これは平成26年1月から平成26年5月の間のみ検出されている。平成25年度、26年度に検出されたGII.17は全てGII.P17-GII.17であった。

表1 感染症サーベイランスの検体から検出されたノロウイルスの遺伝子型(年度別)

	H24	H25	H26	H27
GI3	1	1		1
GI6	1			
GI7		1		
GII2	5			
GII3	1	4	1	1
GII4	16	6	10	1
GII6		3	7	
GII13			2	
GII14	2			
GII17		2	3	

表2 食中毒事例の検体から検出されたノロウイルスの遺伝子型

年度	日付	事例	整理番号	遺伝子型	備考
平成25年度	H25.11	H25-1	1	GII3	
		H25-1	2	GII4	
	H25.12	H25-2		GII4	
		H25-3		GII4	
平成26年度	H26.4	H26-1	1	GI2	
			2	GI2	
	H27.2	H26-2	1	GII17	
			2	GI7	
			3	GII17	
			4	GII17	
	H27.3	H26-3	1	GI3	
2			GI3		
平成27年度	H27.6	H27-1	1	GI3	
			2	GI3	
	H27.11	H27-2	1	GII17	
			2	GII17	
	H28.2	H27-3		GII4	
				GII4	
H28.3	H27-4	1-1	GI2	同一患者	
		1-2	GII17	〃	
		2	GII17		
		3	GI2		

食中毒事例の検体からはGI.2が2事例、GI.3が2事例、GI.7が1事例、GII.3が1事例、GII.4が4事例、GII.17が3事例検出され(表2)、1つの事例で複数の遺伝子型が検出されたものもあった。最も多く検出されたGII.4は感染症サーベイランスの検体にも多かったSydney_2012に近縁の株で3事例あった。3事例で検出されたGII.17は全てGII.P17-GII.17であった。

感染症サーベイランス、食中毒事例ともに最も多く検出されたGII.4は、Sydney_2012に近縁の株が2/3を占めた。その他はDen Haag_2006bに近縁の株、NewOrleans_2009に近縁の株で、その3種類の株がほとんどであった。

た。NewOrleans_2009に近縁の株は平成25年以降は検出されてないが、Den Haag_2006bに近縁の株は平成24年度と平成26年度に検出され、Sydney_2012に近縁の株が主流となっても消えること無く残って時折感染を繰り返していると考えられる。

GII.P17-GII.17は平成25年度に検出された2株はKawasaki323に近縁であったが、平成26年度、27年度に検出されたのはKawasaki308に近縁であったことから、最初に検出されたGII.P17-GII.17が残存してその後流行したのではなく、別のタイプが入ってきて北九州で集団発生を引き起こしていたと思われる(図.2)。

今回、平成24年度から27年度までのノロウイルスの遺伝子型を調べて若干の知見を得ることが出来た。今後この調査を続け、さらに知見を増やしていきたい。

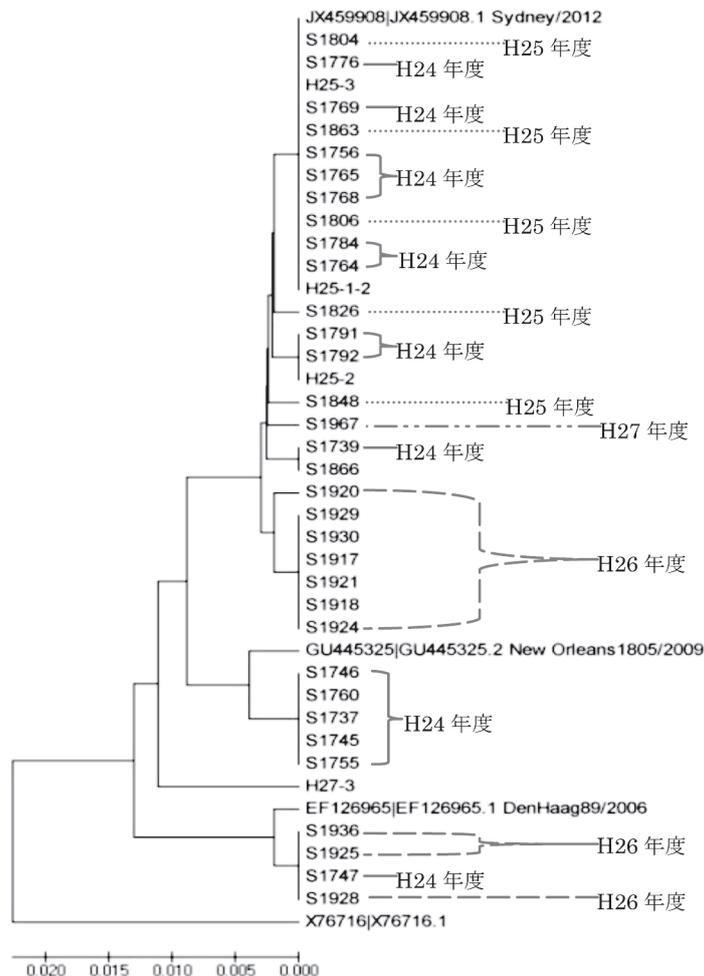


図1 GII.4の系統樹

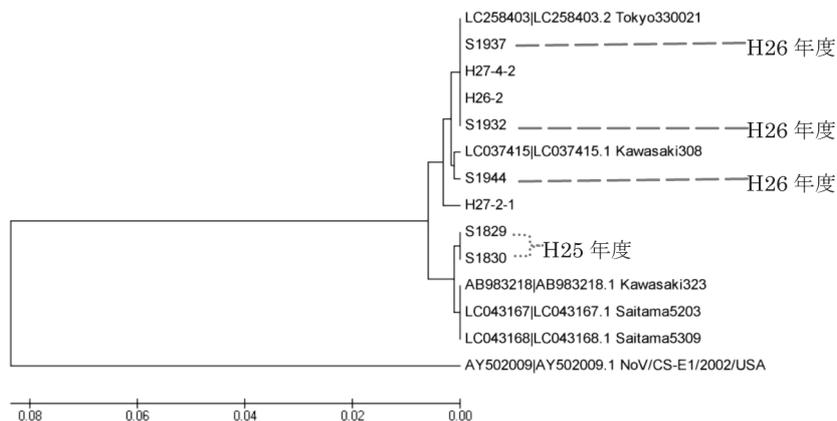


図2 GII.P17-GII.17の系統樹

食品からのサポウイルス検出法の検討

○橘実里、徳崎里美（北九州市保健環境研究所）

1 はじめに

サポウイルスはノロウイルスと同じカリシウイルス科に属するウイルスで、感染性胃腸炎の原因ウイルスである。札幌市内での胃腸炎集団発生で発見されたことからサポウイルスと呼ばれる。これまでサポウイルスは小児の散発的な感染性胃腸炎の原因と考えられてきたが、近年食中毒の集団感染事例が報告されるようになり、ノロウイルス、ロタウイルスに次いで、報告数が多い状況である。

食中毒の際、糞便に加え食品からのウイルス検出が可能になれば感染経路の特定に役立つ。しかし、食品検体は糞便等の検体とは異なりウイルス量が極めて少ないため、検出が困難である。ノロウイルスによる食中毒は件数が非常に多いため、食品からの検出法の検討についての報告件数も多いが、サポウイルスについての報告はノロウイルスほど多くない。

今回、厚労省の通知法などを参考に、より回収率の高いサポウイルスの検出法を検討し、食中毒の原因と推定される食品からの本ウイルスの検出を試みた。

2 食品からのウイルス検出法の検討

2-1 方法

食品からのウイルス検出法としては、厚労省から通知されている「ノロウイルスの検出法」及び「A型肝炎ウイルスの検出法」の二つがある。「A型肝炎ウイルスの検出法」の中の「表面汚染が推定される食品の処理」は食品の表面がA型肝炎ウイルスによって汚染された場合を想定した検出法であり、ウイルスがより効率的に回収できるよう改良されている。ウイルスによる食中毒では、調理従事者などの手指等を介して食品の表面がウイルスに汚染されていることが多いため、検出法として本法が適していると考えられる。そこで本法を選択し、サポウイルスを含む便で表面を汚染した食品について本法によるウイルスの添加回収試験を行った。検出法の流れを図1に示す。

食品検体としては、その成分や取扱い易さの観点から、パン(炭水化物の多いもの)・唐揚げ(タンパク質・脂質の多いもの)・ポテトサラダ(炭水化物・脂質の多いもの)を用いて検査を行った。表面を汚染するウイルス液は、サポウイルス食中毒の患者便からPBS(-)で10%乳剤を調製し、10,000 rpmで10分遠心後、その上清をPBS(-)で10倍希釈したものをを用いた。

食品のウイルス検査においては、食品成分由来の夾雑物が濃縮液に混入しRNA抽出効率や酵素反応に影響することで検出を困難にしている。本法はフィルターろ過やその後の遠心処理により、夾雑物の混入を抑えた検出法であるが、さらに処理を加えることで回収率上昇の可能性があると考えた。そこで、「食品衛生検査指針2015」をもとに、炭水化物の分解除去を目的としたアミラーゼ処理、細菌が食品成分を栄養源として分解することを利用した細菌処理を行いその効果を検討した。細菌処理には *Klebsiella oxytoca* をトリプチケースソイブイオンで35°C、20時間で2代継代培養しこの培養液を 10^7 CFU/mlとなるようにPBS(-)で調製しサンプル10 ml当たり100 μ l添加した。

最も回収率が高かった検出法については、ウイルス液を10、 10^2 、 10^3 倍に希釈したものを添加し、検出下限も同様に調べた。

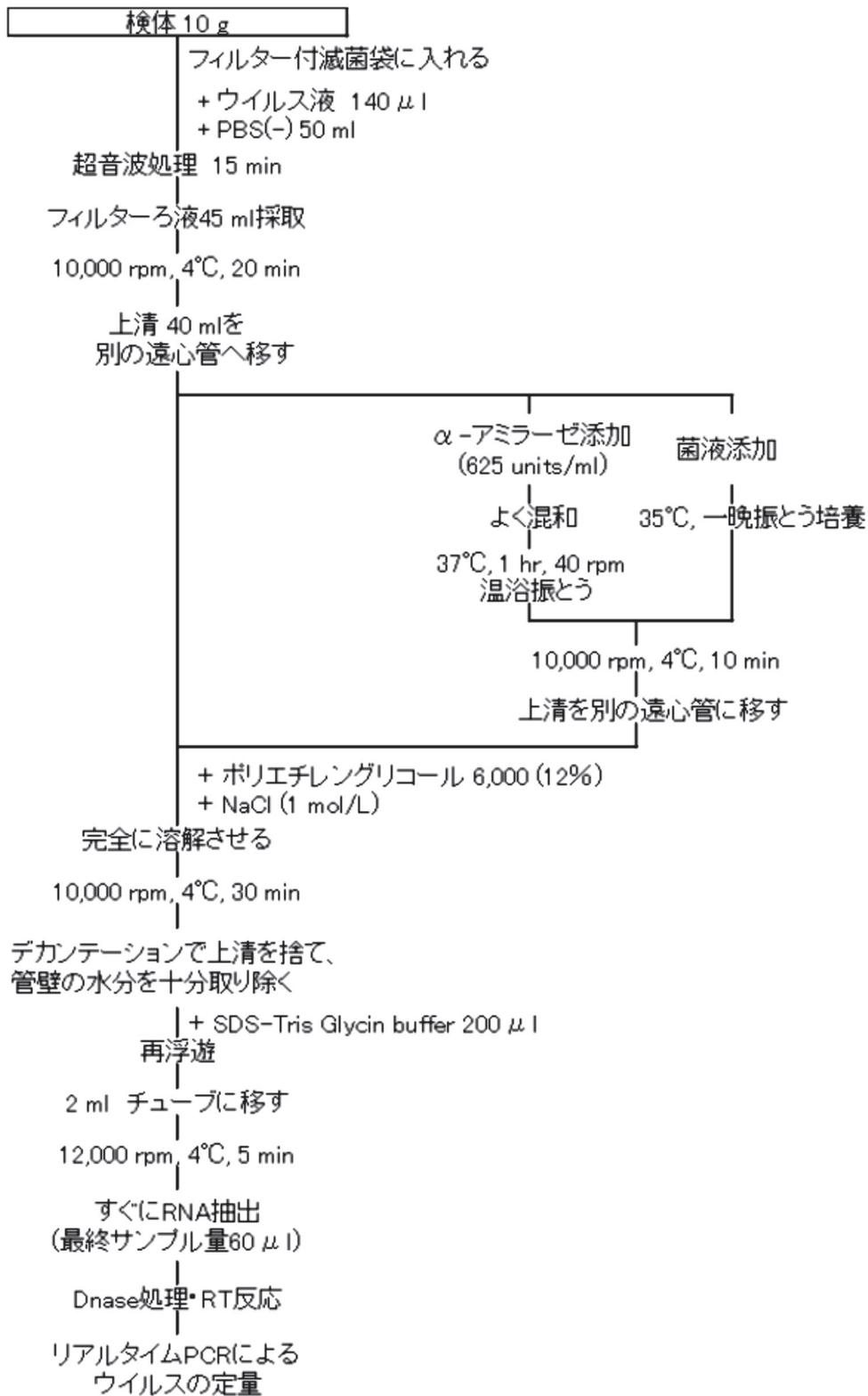


図1 検出法の流れ

2-2 結果

添加回収試験の結果、回収されたウイルスのコピー数と回収率は表1のようになった。

アミラーゼ処理をした場合と無処理の場合で回収率を比較すると、パン・唐揚げを検体としたとき、回収率に大きな差は見られなかった。ポテトサラダでは、無処理の場合の回収率が1%未満であったが、アミラーゼ処理をすると無処理よりも5倍以上回収率が上昇し、アミラーゼ処理の効果が見られた。

細菌処理をした場合、唐揚げとポテトサラダでは無処理の場合とほぼ回収率は変わらなかったが、パンでは回収率が大幅に低下した。

したがって、「A型肝炎ウイルスの検出法」を用いた場合はアミラーゼ処理を加えた方法が適切であると判断した。また、3食品のうち回収率が最も高かった唐揚げで本法の検出限界を求めた結果、 $5 \times 10^3 \sim 5 \times 10^4$ コピーの汚染量が必要であることが分かった。

表1 食品成分由来夾雑物の除去法の比較(n=3)

食品	処理方法	回収されたウイルスのコピー数	回収率 (%)
パン	無処理	5.4×10^4	3.2
	アミラーゼ処理	4.7×10^4	2.8
	細菌処理	1.2×10^3	0.1
唐揚げ	無処理	1.6×10^5	9.3
	アミラーゼ処理	1.1×10^5	6.6
	細菌処理	1.2×10^5	6.9
ポテトサラダ	無処理	1.2×10^4	0.7
	アミラーゼ処理	6.4×10^4	3.8
	細菌処理	1.4×10^4	0.8

添加したウイルス液のコピー数： 1.7×10^6 コピー

3 原因と推定される食品からのサポウイルスの検出

3-1 方法

「A型肝炎ウイルスの検出法」にアミラーゼ処理を加えた方法で、サポウイルス食中毒の原因と推定される食品からのウイルス検出を実施した。食品はお弁当(内容は、刺身・焼き魚・煮物・揚げ物・かやくご飯等)で仕切りごとに14品を検査した。

3-2 結果

検査の結果、14品全てからサポウイルスは検出されなかった。

4 パンを使った追加実験

4-1 方法

アミラーゼは炭水化物を分解する酵素であるため、パンとポテトサラダに対して効果があると考えられるが、今回はパンでは効果が見られなかった。パンでは、フィルターろ過と遠心処理により、アミラーゼによる分解の対象となる夾雑物が十分に取り除かれていたためと考えられる。一方、ポテトサラダでは、フィルターろ過・遠心処理の後にも液表面に膜状の夾雑物が残っており、これをアミラーゼが分解し回収率を上昇させたと推測される。

また、パンとポテトサラダは回収率が低く、表面に付着したウイルスが食品から分離しにくく、遠心処理の際に食品とともに沈殿した可能性がある。図1よりも前の段階でアミラーゼ処理や細菌処理を行えば効果が得られると考えられた。

そこでパンについて、超音波処理後の上清及びフィルターろ液にアミラーゼ処理を行い、無処理のものと回収率を比較した。

4-2 結果

回収されたウイルスのコピー数と回収率を表2に示す。超音波処理後の上清に対してアミラーゼ処理を行った場合、無処理よりも2倍ほど回収率が上昇し、アミラーゼ処理の効果が見られた。一方、フィルターろ液にアミラーゼ処理を行ったものは、アミラーゼ処理の効果は見られなかった。

表2 パンのアミラーゼ処理実施段階の違いによる回収率の比較(n=3)

アミラーゼ処理実施段階	回収されたウイルスのコピー数	回収率 (%)
無処理	1.7×10^5	3.4
超音波処理後	2.9×10^5	6.0
フィルターろ過後	1.2×10^5	2.5

添加したウイルス液のコピー数： 4.9×10^6 コピー

5 まとめ

「2 食品からのウイルス検出法の検討」で2つの食品成分由来夾雑物の除去法の回収率を比較した結果、サポウイルスの検出にはアミラーゼ処理を加えた方法で効果が見られた。この検出法でサポウイルス食中毒の原因と推定される食品を検査した結果、サポウイルスは検出されなかった。

パンでアミラーゼ処理の効果がなかったことから、パンについてアミラーゼ処理の実施段階の違いによる回収率を比較した結果、超音波処理後の上清にアミラーゼ処理を行ったものでアミラーゼの効果が見られた。

通常、 $10 \sim 100$ 個のウイルス量の経口摂取で感染が成立するが、本法(図1)で検出するには、 $5 \times 10^3 \sim 5 \times 10^4$ 個のウイルス量で汚染されている必要があり、食中毒の感染経路の特定に用いるには更なる改善が求められる。また、今回はパン・唐揚げ・ポテトサラダの3食品で回収率を比較したが、食品の種類や成分の違いによっても回収率が異なる。今後は他の報告を参考に、回収率が高いとされる「パンソルビン・トラップ法」等の検出法も検討していきたい。

循環式公衆浴場におけるレジオネラ属菌の定着性について

北九州市保健環境研究所 藤田 景清

【目的】

本市では浴槽水を原因とするレジオネラ症対策として、平成19年より夏期および冬期に循環式公衆浴場におけるレジオネラ属菌の汚染状況を調査している。当所で菌種同定と血清型別を実施しているが、複数年にわたり、同じ施設で同じ血清型が分離される事例が認められ、同一の菌が定着している可能性が示唆された。そこで、同じ血清型を示した菌株の遺伝子解析を行い、菌株間の相同性を比較検討した。また、菌の定着には、バイオフィルムの形成が関与すると考えられ、培養器および培養温度を比較検討したところ、若干の知見が得られたので報告する。

【方法】

(1) 相同性の比較検討について

レジオネラ属菌の分離、菌種同定、血清型別は「新版レジオネラ症防止指針」（平成11年11月）に準じて行った。浴槽水検体の濃縮および処理は、ろ過濃縮（0.45 μm ニトロセルロース膜）および加熱処理（50℃ 30分間）を実施した。菌株間の相同性を比較するための遺伝子解析には、レジオネラ ニューモフィラと菌種同定され、同一血清型の菌株が同じ施設内の浴槽で採取され、かつ、採取された時期が異なる菌株を試験に用いた。遺伝子解析は病原体検出マニュアル「レジオネラ症」（平成23年10月7日改訂）を参考に、制限酵素 Sfi I を用いた Chang ら¹⁾の方法による PFGE 法（改良法）で実施した。相同性の分類は、Tenover ら²⁾の分類基準に従い、4バンド以上の違いを異なる遺伝子パターンとして分類した。

(2) バイオフィルムの培養器および培養温度の比較検討について

レジオネラ症で最も検出の多い菌種血清型がレジオネラ ニューモフィラ血清型1であることから、平成28年度に当所で浴槽水より分離した同血清型の菌株を使用した。培養器については内径の同じ滅菌試験管（材質：未使用ガラス製、ビーズ損傷ガラス製、未使用ポリスチレン製、未使用ポリプロピレン製）および同径滅菌シリコン製チューブを用いた。また、培養温度については36℃、25℃の設定温度で、1～2週間一定菌量をBYEプロスにて静置培養して、バイオフィルム形成能および培養器への固着能を比較した。バイオフィルムの染色は、培養液を廃液後、静かに滅菌蒸留水で3回洗浄したのち、0.1%(w/v)クリスタルバイオレット水溶液にて40分間染色し、水洗風乾後、倒立顕微鏡を用いて観察した。また、バイオフィルムの定量は、染色後の培養器に95%エチルアルコールを加え色素を溶解後、分光光度計により590nmで光学濃度（OD値）を測定し、OD値の強弱をバイオフィルム形成能の強弱として判定した。さらに方法（1）で得られた結果より、A施設から分離した3血清型のバイオフィルム形成能を比較した。

【結果】

(1) 相同性の比較検討について

市内7施設において、同一血清型の菌株が同一施設内の異なる浴槽水や採水時期の異なる浴槽水から分離された計40菌株を比較した。血清型1は、A施設2株は同一パターン、C施設7株は3パターンを示した。血清型3は、B施設3株は2パターン、G施設4株は2パターンを示した。血清型5は、E施設3株は同一パターンを示した。血清型6は、A施設7株はすべて異なるパターン、C施設3株は同一パターンを示した。血清型9は、F施設3株は2パターンを示した。血清型10は、A施設2株、B施設2株、C施設2株は、それぞれ施設毎に同一パターンを示したが、D施設2株は異なるパターンを示した（表1）。

(2) バイオフィルムの培養器および培養温度の比較検討について

培養温度の比較では、36℃に比べ25℃で培養した場合に、バイオフィルム層を厚く形成した。また、培養器への固着能においても、25℃で培養した場合に、よりバイオフィルムの固着を強く認めた。培養器の比較では、未使用の試験管では、材質がガラス製の場合にポリスチレン製、ポリプロピレン製より多く形成した。また、ガラス試験管をガーネットビーズで1分間攪拌し内壁を傷つけた場合には、さらに多くのバイオフィルムの形成を認めた。シリコン製チューブではシリコン自体が染色されたが、バイオフィルム形成能は0.66（OD値）となりガラス製に劣った（表2）。また、A施設では相同性の認められた血清型1および10、相同性の認められなかった血清型6全てにバイオフィルム形成能を認めた（表3）。

【考察】

市内7施設で分離された同一血清型菌株の相同性をPFGE法で遺伝子解析したところ、それぞれの施設毎に同一あるいは類似した特徴的な遺伝子パターンを保有することが認められた。このことから、同一の菌株に経年的な若干の遺伝子変異が起こっていた場合でも、施設内に同一の菌が定着している可能性が示唆された。その一方で、血清型6のA施設では、同一浴槽でも異なる採水時期から分離した菌株間に相同性は認めなかった。このことから、本菌が定着するには、施設毎に定着に参与する何らかの要因があるものと考えられた。今回、レジオネラ属菌が形成するバイオフィルムを定着性の一要因と考え検討した。25°Cでビーズ損傷ガラス製試験管を用いて本菌を培養したところ、A施設から分離した相同性に違いのある3血清型すべてにバイオフィルム形成能を認めた。本試験では、レジオネラ属菌の施設への定着には、バイオフィルムの形成能よりはるその定着能に違いがあることが推測され、今後は、バイオフィルムの耐熱性および耐塩素性（消毒薬抵抗性）の定着性に及ぼす影響を検討し、本菌の防除対策に役立てたい。

<参考文献>

- 1) Chang B, Amemura-Maekawa J, Watanabe H. Jpn J Infect Dis. 62: 54-56, 2009
- 2) Tenover, et al. J Clin Microbiol. 33: 2233-2239, 1995

表1 PFGE 法に供した分離菌株一覧

分離年・時期	血清型	施設名	浴槽番号	PFGE型	
H21	1	A	1	1a-I	
H27			1	1a-I	
H20夏期		C	1	1c-I	
H20夏期			2	1c-II	
H20夏期			3	1c-II	
H20冬期			4	1c-II'	
H20冬期			5	1c-I	
H20冬期			1	1c-II	
H22			6	1c-III	
H23			10	A	1
H26	2	10a-I			
H25	B	1		10b-I	
H26		2		10b-I	
H20	D	1		10d-I	
H25		1		10d-II	
H20	C	7		10c-I	
H22		6		10c-I	
H21	3	B		1	3b-I
H25				3	3b-II
H26			4	3b-II	
H19		G	1	3g-I	
H19			2	3g-I	
H20			1	3g-II	
H20	2	3g-II'			
H19	5	E	1	5e-I	
H20			2	5e-I	
H21			2	5e-I	
H20	6	A	3	6a-I	
H20			1	6a-II	
H21			3	6a-III	
H23			1	6a-IV	
H26			2	6a-V	
H26			1	6a-VI	
H26			3	6a-VII	
H20			8	6c-I	
H20		C	7	6c-I	
H22			6	6c-I	
H25夏期	9	F	1	9f-I	
H25冬期			1	9f-I'	
H27			1	9f-II	

表2 培養器ごとのバイオフィルム形成能

培養器	材 質	OD値/A590
試験管	ガラス（未使用）	0.177
	ガラス（ビーズ損傷）	0.352
	ポリスチレン（未使用）	0.067
	ポリプロピレン（未使用）	0.048
チューブ	シリコン（未使用・培養なし）	0.186
	シリコン（未使用・培養あり）	0.252

(OD 値が高いほうが、バイオフィルム形成能が高い。)

表3 A 施設における各血清型のバイオフィルム形成能 (25°C 3週間培養 ビーズ損傷ガラス試験管使用)

血清型	OD 値/A590
1	0.384
6	0.371
10	0.656

(OD 値が高いほうが、バイオフィルム形成能が高い。)