

【調査研究】

県内における食中毒及び感染症起因菌の疫学的解析

①下痢症・呼吸器感染症起因菌の疫学調査と検査法の検討（平成23年度）

Epidemiological Studies on Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli*,
Legionella and *Corynebacterium ulcerans* in Okayama Prefecture (FY2011)

中嶋 洋, 大畠律子, 石井 学, 檜原幸二*, 仲 克巳** (細菌科)

*岡山赤十字病院第一小児科, **くらしき作陽大学食文化学部現代食文化学科

Hiroshi Nakajima, Ritsuko Ohata, Manabu Ishii, Kouji Narahara*
and Katsumi Naka** (Department of Bacteriology)

*Department of Pediatrics, Okayama Red Cross General Hospital

**The Department of Contemporary Food Culture, Kurashiki Sakuyo University

要 旨

志賀毒素産生性大腸菌 (STEC) 感染症, レジオネラ症及びコリネバクテリウム・ウルセランスによる感染症の予防対策に資するため, 平成23年度に県内で分離されたSTEC, レジオネラの疫学解析と, コリネバクテリウム・ウルセランス等の産生するジフテリア毒素に対する牛血清の抗体保有状況を調査した。STECは, ヒト由来株62株中, O血清群157が27株 (43.5%), O血清群26は20株 (32.3%) であり, O157及びO26以外のO血清群 (103, 111, 115, 121, 145, 165) が24.2%分離された。牛直腸便415検体中STECは16.1%検出され, O血清群157は4検体 (1.0%) が陽性であった。ヒトから分離された *L.pneumophila* 血清群3について遺伝子解析を実施したところ, 国内ではじめて分離された遺伝子型の株であった。牛血清のジフテリア抗毒素価は, 62検体中1検体 (1.6%) が0.1IU/mL以上の高い抗毒素価を示し, ジフテリア毒素産生菌による感染が示唆された。今後も, これらの菌について流行状況や汚染実態を継続調査し, 感染予防に役立てるために疫学解析を行う必要があると考える。

[キーワード: 志賀毒素産生性大腸菌, レジオネラ, コリネバクテリウム・ウルセランス, 疫学]

[Key words: shiga toxin-producing *Escherichia coli*, *Legionella*, *Corynebacterium ulcerans*, epidemiology]

1 はじめに

県下で発生した志賀毒素産生性大腸菌 (以下「STEC」という。) 感染症やレジオネラ症及び過去に県内で患者が発生したジフテリア様毒素を産生するコリネバクテリウム・ウルセランスによる感染症について, 感染源・感染経路の究明や発生予防を目的として, 計画的に調査を実施している。本報告では, 平成23年度に収集したヒトおよび食品由来株と, 動物及び浴槽水等から分離した菌株を用いた疫学解析結果と牛のジフテリア抗毒素価保有状況について報告する。

2 材料及び方法

2.1 菌株及び検体

STECの検査は, 県内で平成23年度にヒトから分離されたSTEC株62株と, 牛直腸便415検体, 牛糞堆肥27検体, 牛飼料7検体及び有機野菜60検体を用いた。

レジオネラの検査には浴槽水等49検体と, 保健所が浴

槽水等から分離したレジオネラ属菌133株及び患者由来株9株を用いた。コリネバクテリウム・ウルセランスの調査は, 牛血清62検体を用いた。

2.2 検査法

各菌種の検査は, 以下の方法で実施した。

1) 生化学的性状試験

STECの性状試験は, IDテストEB20 (日水) を用いて菌の同定を行った。

2) 血清型別

STEC及びレジオネラの血清型別は, 病原性大腸菌免疫血清 (デンカ生研) とレジオネラ免疫血清 (デンカ生研) を用いて実施した。

3) STECの毒素 (STX) 型別及びジフテリア毒素遺伝子の保有

STECの毒素型別は, ラテックス凝集反応による大腸菌ペロ毒素検出用キット (デンカ生研) 及びPCR

法¹⁾により実施した。コリネバクテリウムのジフテリア毒素遺伝子保有は、PCR法²⁾により実施した。

4) ジフテリア抗毒素価の測定

ジフテリア抗毒素価の測定は、宮村ら³⁾の培養細胞法により、国立感染症研究所細菌第二部第三室に依頼して実施した。

5) パルスフィールドゲル電気泳動法によるDNAパターンの解析

STECのパルスフィールドゲル電気泳動（以下PFGE）法は、寺嶋ら⁴⁾のプロトコールにより実施した。また、DNAパターンによる型別（以下「PFGE」型別という。）は、国立感染症研究所細菌第一部に依頼して実施した。

6) Sequence-Based Typing (SBT)

レジオネラ株のSBTを用いた型別（Sequence Type (ST)）^{5)・6)}は、国立感染症研究所細菌第一部に依頼して実施した。

3 結果及び考察

3.1 県内で分離されたSTECの疫学調査

平成23年度のヒト由来STEC月別検出状況を、表1に示した。

本年度収集した62株は、4月と3月を除いたすべての月で検出された。6月～9月は16.1～22.6%と高率に検出され、腸管出血性大腸菌感染症注意報が発令された。昨年に引き続いて本年度も分離株数が例年よりやや少なかった。これは、富山県を中心に焼肉チェーン店のユッケによるSTEC感染症があり、例年以上に本菌に対する注意喚起がなされたため、患者発生数の減少に繋がった可能性が考え

られる。

検出されたSTECの血清型・毒素型を表2に示した。

STECの血清型・毒素型は12種類に分類され、O血清群157は27株（43.5%）、O血清群26は20株（32.3%）で、これら47株が分離株全体の75.8%を占めた。また、本年度はこれら以外にも、O103、O111、O115、O121、O145、O165などの多種O血清群が検出された。

STEC O血清群157及び26のPFGE型を、表3-1及び表3-2に示した。

O血清群157は15種類、O血清群26は7種類に型別され、特にO157:H7 STX1,2及びO26:H11 STX1の株は、それぞれ多様なPFGE型株が検出された。家族由来株は同一のPFGE型を示す株が多かったが、一部の株では同じ家族内で遺伝子の変異が見られた。

牛直腸便、牛糞堆肥、牛飼料及び有機野菜のSTEC検出状況及び検出されたSTECの血清型・毒素型を、表4及び表5に示した。

牛直腸便415検体中67検体（16.1%）からSTECが検出され、このうちO血清群157は4検体（1.0%）から検出された。牛糞堆肥は27検体中2検体（7.4%）から検出されたが、牛飼料7検体及び有機野菜60検体では、STECは検出されなかった。牛直腸便及び牛糞堆肥から検出されたSTECの血清型・毒素型は30種類に分類され、例年どおりO血清群型別不能（OUT）が69検体中48検体（69.6%）を占めた。O血清群157は昨年度牛直腸便から検出されなかったが、本年度は4検体から検出されており、ヒトへの感染源として継続した牛の保菌実態調査が必要であると思われる。

表1 ヒト由来STEC月別検出状況

月	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3	計
分離株数	0	3	14	13	10	11	5	1	2	2	1	0	62
(%)	0.0	4.8	22.6	21.0	16.1	17.7	8.1	1.6	3.2	3.2	1.6	0.0	

表2 ヒトから検出されたSTECの血清型・毒素型

血清型	毒素型	株数	(%)
O103:H2	1	4	6.5
O111:H-	1,2	1	1.6
O115:H10	1	3	4.8
O121:H19	2	3	4.8
O145:H-	1	1	1.6
O157:H-	1,2	1	1.6
O157:H7	2	6	9.7
O157:H7	1,2	20	32.2
O165:H-	1,2	3	4.8
O26:H-	1	1	1.6
O26:H-	1,2	1	1.6
O26:H11	1	18	29.0
計		62	

表3-1 ヒト由来STEC O157のPFGE型

血清型	毒素型	PFGE型	株数	備考
O157:H-	1,2	g70	1	
	2	c389	2	家族由来株
O157:H7	1,2	d342	2	
		g117	1	
		g159	1	
		g161	1	
		g163	1	
		g216	1	
		g419	1	
		g421	1	
		g422	1	
		g423	1	
		g425	2	家族由来株
		g427	3	
		g61	2	家族由来株
計			21	

表3-2 ヒト由来STEC O26のPFGE型

血清型	毒素型	PFGE型	株数	備考
O26:H-	1	g36	1	
	1,2	b48	1	
O26:H11	1	g37	1	
		g38	7	家族由来株3株
		g49	5	家族由来株2株+2株
		g50	2	家族由来株
		g51	2	g50の家族由来株1株
計			19	

表4 牛由来検体のSTEC検出状況

検体名	検体数	陽性検体数	検出率(%)
		(O157陽性)	(O157陽性)
直腸便	415	67*	16.1
		(4)	(1.0)
牛糞堆肥	27	2	7.4
		(0)	(0)
牛飼料	7	0	0
		(0)	(0)
有機野菜	60	0	0
		(0)	(0)
合計	509	69	27.1
		(4)	(0.8)

*：3検体から2種類の血清型株を検出

表5 牛直腸便および牛糞堆肥由来STECの血清型・毒素型

検体名	血清型	毒素型	陽性検体数	検出率(%)
牛直腸便	O119:H-	2	2	2.9
	O119:H7	1	1	1.4
	O119:HUT	1	1 ^a	1.4
	O124:H19	2	1	1.4
	O157:H7	1,2	1 ^b	1.4
	O157:H7	2	3 ^a	4.3
	O26:H11	1	1	1.4
	O28ac:H23	2	1	1.4
	O28ac:H7	2	1	1.4
	O55:H21	2	1	1.4
	O6:H34	2	3	4.3
	O74:H20	2	1	1.4
	O74:H27	2	1	1.4
	O74:H28	2	2	2.9
	O74:HUT	2	1	1.4
	O8:H19	2	1	1.4
	O91:H21	2	1	1.4
	OUT:H-	2	12 ^{b,c}	17.4
	OUT:H11	1,2	1 ^c	1.4
	OUT:H11	2	1	1.4
	OUT:H19	2	5	7.2
	OUT:H2	2	3	4.3
	OUT:H21	2	7	10.1
	OUT:H28	1	1	1.4
	OUT:H28	2	1	1.4
	OUT:H4	2	1	1.4
OUT:H51	2	1	1.4	
OUT:HUT	1	10	14.5	
OUT:HUT	2	4	5.8	
牛糞堆肥	OUT:H-	1	1	1.4
	OUT:HUT	1	1	1.4
計			69	

a, b, c: 各々1検体から2種類の血清型菌を検出

3.2 浴槽水等のレジオネラ汚染調査

浴槽水等について実施したレジオネラ汚染調査結果を表6と表7に示した。

レジオネラを培養法により検査した結果、浴槽水43検体中4検体(9.3%)、冷却塔水6検体中5検体(83.3%)から検出された。浴槽水は*L.pneumophila*血清群1、6、9群が、冷却塔水では*L.pneumophila*血清群1、5、7、13群とUT、それにレジオネラ属菌が検出された。一方、保健所の検査で浴槽水等から検出されたレジオネラは、*L.pneumophila*血清群1、3、4、5、6、8、9、10、12

群とUT及び*L.micdadei*とレジオネラ属菌であった。

患者から分離されたレジオネラを表8に示した。

55歳以上の男性7名及び女性2名から検出され、全国的な傾向と同様に高齢男性からの検出が多かった。検出菌は*L.pneumophila*血清群1が9株中6株と多く、その他血清群2及び3が検出された。血清群1ではST1077が3株、ST120が2株検出され、同じ感染源の可能性が示唆された。血清群3の2株もST93と同じ感染源の可能性が示されたが、これらの株は国内ではじめて分離されたST株であったため、今後本菌の感染源の究明が重要であると考えられる。

表6 浴槽水等のレジオネラ検査結果

検体名	検体数	陽性検体数(%)	菌種	血清群	株数
浴槽水	43	4 (9.3)	<i>L.pneumophila</i>	1	3
				6	3
				9	1
冷却塔水	6	5 (83.3)	<i>L.pneumophila</i>	1	4
				5	1
				7	1
				13	1
			UT	1	
			<i>Legionella spp.</i>		2
計	49	9 (18.4)			17

UT: untypable

表7 保健所から収集したレジオネラ株

検体名	菌種	血清群	株数
浴槽水	<i>L.pneumophila</i>	1	16
		3	21
		4	7
		5	22
		6	25
		8	1
		9	2
		10	14
		12	2
		UT	10
	<i>L.micdadei</i>		1
冷却塔水	<i>L.pneumophila</i>	1	1
		UT	3
	<i>Legionella spp.</i>		1
プール水	<i>L.pneumophila</i>	3	3
		5	2
		10	2
計			133

表8 患者由来レジオネラ株

No	年齢	性別	分離年月	血清群	ST	PFGE	症状
1	55	女	2011.07	1	1077	未実施	発熱、胸部異常影(糖尿病あり)、呼吸困難
2	78	男	2011.10		120		発熱、呼吸困難、肺炎
3	78	男	2011.11		120		腹痛、呼吸困難、意識障害、肺炎、多臓器不全
4	91	男	2011.11		1077		発熱、咳嗽、肺炎
5	69	男	2011.12		1077		発熱、咳嗽、意識障害、肺炎
6	55	男	2012.02		42		発熱、呼吸困難、肺炎
7	63	男	2011.06	2	354	未実施	発熱、咳嗽、肺炎から死亡(糖尿病あり)
8	77	男	2011.07	3	93	同一	胸部異常影、症状無し
9	59	女	2011.09		93		胸部異常影、症状無し

ST : sequence type

3.3 牛のジフテリア抗毒素価保有状況

牛血清を用いてジフテリア抗毒素価を測定した結果を、表9に示した。

牛血清62検体のうち、抗毒素価が0.01IU/mL以上を示したのは2検体(3.2%)、特に0.1IU/mL以上の高い抗毒素価を示したものが1検体(1.6%)あった。ヒトでは、以前は0.01IU/mL以上の抗毒素価を感染防御レベルとされてきたが、最近では0.1IU/mL以上が必要であると考えられている⁷⁾。牛ではコリネバクテリウム・ウルセランスによる乳房炎などが報告⁸⁾されており、抗毒素価が0.01IU/mL以上であった牛では、ジフテリア毒素産生性のコリネバクテリウムによる感染の可能性が示唆されるため、今後継続して抗毒素価を指標とするジフテリア毒素産生性コリネバクテリウムによる感染実態の調査を行う予定である。

なお、レジオネラの調査については、平成23年度厚生労働科学研究費補助金(健康安全・危機管理対策総合研究事業)「公衆浴場等におけるレジオネラ属菌対策を含めた総合的衛生管理手法に関する研究」の研究班で、コリネバクテリウム・ウルセランスの調査は、平成23年度厚生労働科学研究費補助金(新型インフルエンザ等新興・再興感染症

研究事業)「ワンヘルス理念に基づく動物由来感染症制御に関する研究」の研究班による調査の一環として実施したものである。

表9 牛血清のジフテリア抗毒素価

抗毒素価 IU/ml	検体数	保有率(%)
<0.01	60	96.8
0.01<, <0.1	1	1.6
0.1<	1	1.6
計	62	

謝 辞

本調査の実施に際して、PFGE型別をお願いしました国立感染症研究所の寺嶋 淳先生、ST型別をお願いしました国立感染症研究所の前川 純子先生、ジフテリア抗毒素価の測定をお願いしました国立感染症研究所の小宮 貴子先生、菌株の分与や検体採取にご協力いただきました関係機関の先生方に深謝いたします。

文 献

- 1) 小林一寛：腸管出血性大腸菌の同定法 2. PCR法。臨床検査, 36, 1334~1338, 1992

- 2) Pallen, M.J. : Rapid screening for toxigenic *Corynebacterium diphtheriae* by the polymerase chain reaction, J.Clin.Pathol., 44, 1025-1026, 1991
- 3) Miyamura, K., Nishio, S., Ito, A., Murata, R., and Kono, R. 1974. Micro cell culture method for determination of diphtheria toxin and antitoxin titres using VERO cells. I.Studies on factors affecting the toxin and antitoxin titration. J.Biol.Stand. 2 : 189-201.
- 4) 寺嶋 淳, 泉谷秀昌, 三戸部治郎 : 食品由来感染症の細菌学的疫学指標のデータベース化に関する研究. 新興・再興感染症研究事業平成15年度総括・分担研究報告書2004, 10~21, 2004
- 5) Gaia V, Fry NK, Afshar B, Luck PC, Meugnier H, Etienne J, Peduzzi R, and Harrison TG. : Consensus sequence-based scheme for epidemiological typing of clinical and environmental isolates of *Legionella pneumophila*, J.Clin.Microbiol., 43, 2047-52, 2005
- 6) Ratzow S, Gaia V, Helbig JH, Fry NK, Luck PC. : Addition of neuA, the gene encoding N-acylneuraminate cytidylyl transferase, increases the discriminatory ability of the consensus sequence-based scheme for typing *Legionella pneumophila* serogroup 1 strains, J.Clin.Microbiol., 45, 1965-1968, 2007
- 7) Hasselhorn HM, Nubling M, Tiller FW, Hofmann F. : Factors influencing immunity against diphtheria in adults, Vaccine, 16(1), 70-75, 1998
- 8) Barrett NJ : Communicable disease associated with milk and dairy products in England and Wales : 1983-1984, J Infect, 12, 265-272, 1986