

岡山県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 22 年度)

中嶋 洋, 大島律子, 石井 学, 榎原幸二*, 仲 克巳** (細菌科)

*岡山赤十字病院第一小児科, **くらしき作陽大学現代食文化学科

【調査研究】

岡山県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22年度)

Epidemiological Studies on Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* and *Corynebacterium ulcerans* in Okayama Prefecture (FY2010) and Examination of Rapid Detection Methods for *Legionella*

中嶋 洋, 大島律子, 石井 学, 植原幸二*, 仲 克巳** (細菌科)

*岡山赤十字病院第一小児科, **くらしき作陽大学現代食文化学科

Hiroshi Nakajima, Ritsuko Ohata, Manabu Ishii, Kouji Narahara*

and Katsumi Naka** (Department of Bacteriology)

要 旨

志賀毒素産生性大腸菌(STEC)感染症, レジオネラ症およびコリネバクテリウム・ウルセランスによる感染症対策の予防と対策に資するため, 平成22年度に県内で分離されたSTECの疫学解析を実施した。また, レジオネラの迅速検査法の検討及びコリネバクテリウム・ウルセランスのヒトおよび動物保菌調査を実施した。STECは, ヒト由来株63株中血清型O157:H7は毒素型STX1,2(50.8%), STX2(17.5%)が, O26:H11はSTX1(25.4%)が検出され, これらの血清型がSTEC全体の93.7%を占めた。牛のSTEC保菌率は12.6%で, 牛内臓1検体(2.9%)からO血清群157が検出された。レジオネラの迅速検査法として新たに検討した生菌を検出する逆転写反応後のリアルタイムPCRは, 培養法とほぼ同程度の検出率であった。ヒトおよび牛からコリネバクテリウム・ウルセランスの分離を試みたが, 本年度は陰性であった。これらの結果をもとに, 更に継続調査を行い, 感染症予防対策に役立つ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

岡山県下で毎年多数の患者を出している志賀毒素産生性大腸菌(以下STECと略す)の感染源・感染経路の究明や発生予防を目的として, ヒトや食品由来株の収集と動物からの分離菌株を用いて疫学解析を行っている。また, レジオネラ症の発生予防を目的として, 感染源となる浴槽水などの衛生管理に迅速な結果が得られる遺伝子検査法の確立を検討している。ジフテリア様毒素を産生するコリネバクテリウム・ウルセランスについては, 過去に県内で患者が発生したことから, 感染源と考えられる動物の保菌状況を調査している。これらの菌種を対象とした調査は長期間継続して実施しており, 本報告では平成22年度の結果を報告する。

2 材料及び方法

(1) 菌株及び検体

県内で平成22年度にヒトから分離されたSTEC株63株と, 牛直腸便348検体, 牛糞堆肥25検体, 牛肉22検体および牛内臓(肝臓, 小腸, 大腸, センマイ等)35検体を用いた。

レジオネラの検査および検査法の比較には浴槽水等30検体を, コリネバクテリウム・ウルセランスの調査にはヒト咽頭スワブ1検体と牛病畜の関節液7検体及び乳汁3検体を用いた。

(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, コリネバクテリウムはApiコリネ(バイオメリュ)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

菌免疫血清及びレジオネラ免疫血清(デンカ生研)を用いて実施した。

3) STEC毒素(STX)型別およ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ベ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) 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法(以下PFGEと略す)は、寺嶋ら³⁾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型と略す)は、国立感染症研究所に依頼して実施した。

(3) レジオネラの迅速検査法

レジオネラの迅速検査法は、リアルタイムPCR法(タカラバイオ:以下qPCR法)、逆転写反応後のリアルタイムPCR法⁴⁾(以下RT-qPCR法)および生菌を検出するための逆転写反応後のリアルタイムPCR法⁵⁾(以下LC RT-qPCR法)を用いて行った。定量値は、既知濃度のレジオネラ菌液(長崎 80-045 株)およびキット付属のプラスミドDNA溶液を使用し、各検査法のCt値から検量線を作成して求めた。

3 結果及び考察

3.1 岡山県内で分離されたSTECの疫学調査

平成22年度のヒト由来STEC月別検出状況を、表1に示した。

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	1	3	9	10	10	15	5	3	0	2	5	0	63
(%)	1.6	4.8	14.3	15.9	15.9	23.8	7.9	4.8	0.0	3.2	7.9	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	1	1.6
O145:H-	2	1	1.6
O145:H-	1,2	1	1.6
O157:H7	2	11	17.5
O157:H7	1,2	32	50.8
O26:H11	1	16	25.4
O91:HUT	1	1	1.6
計		63	

本年度収集した63株は、12月と3月を除いたすべての月で検出され、特に6月～9月は14.3～23.8%と高率に検出された。本年度は例年に比べ分離株数がやや少なかった昨年度より、さらに分離株が減少した。これは、夏期を中心にしたSTEC感染症の多発傾向は毎年続いているため、それ以外の時期における発生数の減少が一因ではないかと思われる。

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7種類に分類され、このうちO血清群157は43株で分離株全体の68.3%を占め、O157:H7 STX1,2(50.8%)、O157:H7 STX2(17.5%)が検出された。その他O26:H11 STX1も16株(25.4%)と検出率が高かったが、これ以外に3種類のO血清群の菌が分離され、それらの検出率は低かった。

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。

O157:H7 STX1,2は17種類、同STX2は9種類の計26種類に型別され、多様なPFGE型株により感染していたことが示された。O26:H11 STX1は分離株数が少なかったにもかかわらず、6種類のPFGE型に分類された。いずれのO血清群においても、家族であったり同一焼肉店での喫食など、疫学的関連が確認された株間では、PFGE型が同一かほぼ同一のPFGEパターンを示し、疫学情報と良く一致していた。

牛直腸便、牛糞堆肥、牛肉および牛内臓からの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5に示した。

牛直腸便 348 検体中 STEC は 44 検体 (12.6%) から検出されたが、O 血清群 157 は検出されなかった。牛糞堆肥 25 検体および牛肉 22 検体は STEC 陰性であったが、牛内臓 35 検体中 1 検体 (2.9%) から O 血清群 157 が検出され、この検体からは他に O 血清群 159 と型別不能 (以下 OUT) の STEC 2 株が同時に検出された。血清型・毒素型は 26 種類に分類され、OUT は 45 検体中 40 検体 (88.9%) を占めた。O 血清群 157 は牛内臓 (肝臓, 大腸, 心臓, ミノ, ホルモンのミックス) からのみ検出され、検出率は 2.9% と低かったが、牛の STEC 保菌はヒトへの感染源として注意を要するため、さらに継続した保菌実態調査が必要であると考ええる。

表 3-1. STEC O157 の PFGE 型

血清型	毒素型	PFGE型	株数	備考
O157:H7	2	f315	1	家族
		f316	1	
		f331	1	
		f335	1	
		f336	1	
		f34	1	
		f488	1	
		f491	1	
	f497	1		
	1,2	c109	1	
		c148	1	
		c293	1	
		c57	1	
		e772	2	家族、焼肉店で喫食
		f320	1	
		f321	1	
		f323	1	家族
		f324	2	
		f333	1	
		f334	2	
		f439	1	e772の2株と同一の焼肉店で喫食
		f490	1	
		f495	1	e772,f439株と同一の焼肉店で喫食
		f53	1	
		f779	1	
		degadation	5	4株はe772,f439,f495の4株と同一の焼肉店で喫食
計				33

表 3-2. STEC O26 の PFGE 型

血清型	毒素型	PFGE型	株数	備考
O26:H11	1	f18	1	
		f21	1	
		f82	2	家族
		f84	4	家族
		f86	7	家族
		f120	1	
計			16	

3.2 レジオネラ迅速検査法の検討

レジオネラの迅速検査法について検討した結果を、表 6 と図 1-1 および 1-2 に示した。

レジオネラは培養法により浴槽水 8 検体 (26.7%) から検出され、その菌種と血清型は *L.pneumophila* (1 群, 5 群, 6 群, 8 群, 9 群, UT), *L.gormanii* であった。

迅速検査法による結果は、培養法の検出感度である 10cfu/100ml 以上を陽性とした場合、qPCR 法が 13 検体 43.3%, RT-qPCR 法は 14 検体 46.7% が陽性となった。生菌と死菌の両遺伝子を検出するこれらの検査法は、培養法に比べて高感度でより多くの検体からレジオネラが検出された。本年度検討を行った生菌を検出する LC RT-

表 4. 牛由来検体からの STEC 検出状況

検体名	検体数	陽性検体数 (O157)	検出率 (%) (O157)
直腸便	348	44 (0)	12.6 (0)
牛糞堆肥	25	0 (0)	0 (0)
牛肉	22	0 (0)	0 (0)
牛内臓	35	1* (1)*	2.9 (2.9)
合計	373	45 (1)	12.1 (0.3)

*: 重複 (1 検体から 3 種類の血清型株を検出)

表 5. 牛由来 STEC の血清型・毒素型

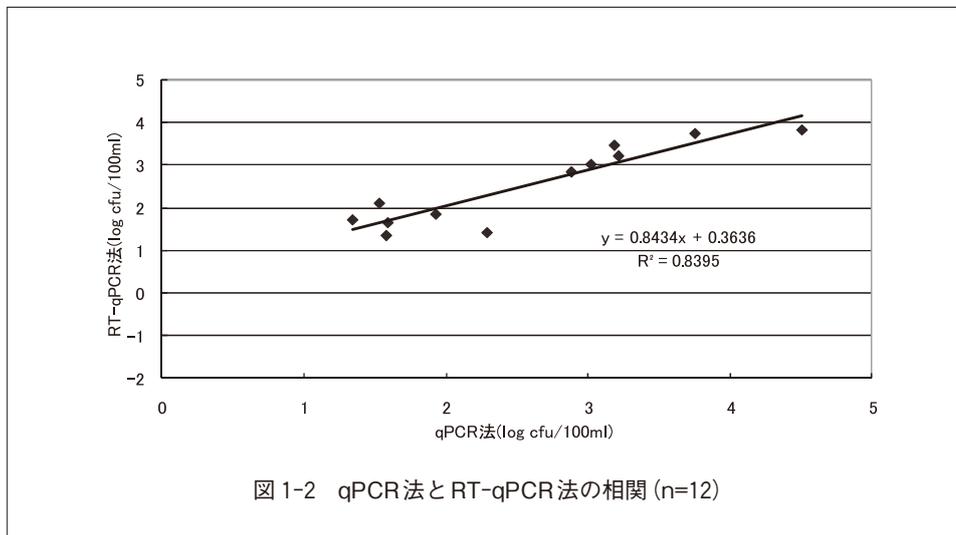
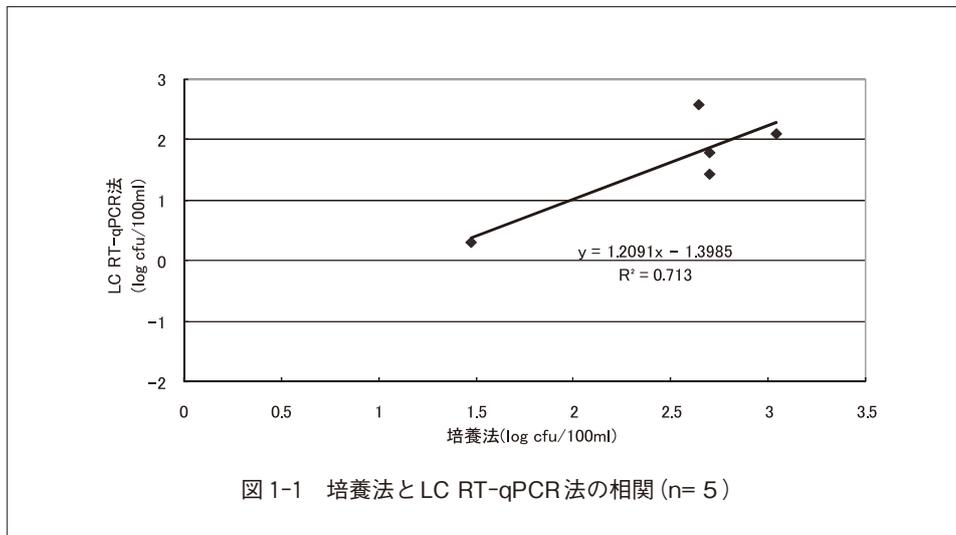
由来	血清型	毒素型	陽性検体数	(%)
牛直腸便	O124:H19	2	1	2.2
	O168:HUT	2	1	2.2
	O25:HUT	2	1	2.2
	O29:H21	2	1	2.2
	O47:HUT	2	1	2.2
	O74:H28	2	1	2.2
	O91:H28	1,2	1	2.2
	OUT:H20	2	1	2.2
	OUT:H-	2	14	31.1
	OUT:H11	2	2	4.4
	OUT:H16	1	1	2.2
	OUT:H18	2	1	2.2
			1	2.2
		1,2	1	2.2
		2	3	6.7
		1	1	2.2
		1,2	1	2.2
		2	4	8.9
		2	1	2.2
	牛内臓	OUT:HUT	1	1
		1,2	1	2.2
OUT:H51		2	1	2.2
OUT:H51		2	1	2.2
計			45	

*陽性検体数は重複を含む。(%)は陽性検体中の割合

表 6. 浴槽水の検査法別レジオネラ検出結果 (n=30)

検査法	陽性検体数	検出率(%)	検出菌名(血清群)
培養法	8	26.7	<i>L. pneumophila</i> (1群、5群、6群、8群、9群、UT)、 <i>L. gormanii</i> 菌数: 10~1,100cfu/100ml
qPCR法*	17(13)	56.7(43.3)	
LC RT-qPCR法**	7	23.3	
RT-qPCR法*	22(14)	73.3(46.7)	
陽性検体計***	17		

* (): 10cfu/100ml以上検出
 * * : Ct(18h)<34かつ△Ct≥1
 * * * : 10cfu/100ml以上検出



qPCR法は、7 検体 23.3%が陽性となり、レジオネラ陽性検体における培養法との定量値の相関は比較的良好であったが、培養法陽性でLC RT-qPCR法陰性となった検体があり、検出率は培養法より低かった。これは、培養法により検出された菌数がいずれも 10 ~ 20cfu/100mlと少

ない検体であったことから、少量の菌に汚染された検体においても確実に菌を検出できるように、検査法の改良を検討する必要があると思われる。qPCR法とRT-qPCR法の定量値の相関は、培養法とLC RT-qPCR法よりさらに良好であった。

3.3 コリネバクテリウム・ウルセランスの検出状況

コリネバクテリウム・ウルセランスの検出結果を、表7に示した。

表7. *C.ulcerans* 調査結果

	検体名	検体数	結果
ヒト	咽頭スワブ	1	陰性
牛	関節液	7	陰性
	乳汁	3	陰性

耳鼻咽喉科を受診した患者の咽頭スワブ1検体と、牛病畜の関節液7検体および乳汁3検体を検査したが、いずれの検体からも本菌は検出されなかった。昨年度の調査では猫の咽頭スワブ5検体(4.1%)から本菌が検出されていることから、本菌のヒトへの感染事例や動物の保菌状況を明らかにするため、引き続き調査を実施する必要があると考える。

なお、レジオネラ迅速検査法についての検討は、平成22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22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)「ワンヘルズ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。

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、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) 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
- 4) 遠藤卓郎, 烏谷竜哉, 青木紀子, 山本純子, 泉山信司：RT-qPCRを用いたレジオネラ属菌迅速検査法の検討, 厚生労働科学研究補助金(健康安全・危機管理対策総合研究事業)「迅速・簡便な検査によるレジオネラ対策に係る公衆浴場等の衛生管理手法に関する研究」平成20年度総括・分担研究報告書, 37-50, 2009
- 5) 中嶋 洋：浴槽水等のレジオネラ属菌検出状況と迅速検査法の検討(平成22年度), 厚生労働科学研究補助金(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」平成22年度総括・分担研究報告書, 78-88, 2011