

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21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，**くらしき作陽大学食文化学部栄養学科

【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21年度）

Epidemiological Studies on Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* and *Corynebacterium ulcerans* in Okayama Prefecture (FY2009) and Examination of Rapid Detection Methods for *Legionella*

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, **くらしき作陽大学食文化学部栄養学科

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

and Katsumi Naka ** (Department of Bacteriology)

要 旨

県下で発生している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の予防に資するため, 平成21年度に県内で分離された志賀毒素産生性大腸菌(STEC)の疫学解析と, 昨年度に引き続いてレジオネラ迅速検査法の検討及びコリネバクテリウム・ウルセランスの動物保菌調査を実施した。STECは, ヒト由来株88株中血清型O157:H7はSTX1,2(60.2%), STX2(17.0%)及びSTX1(4.5%), O157:H-はSTX1,2(2.3%)及びSTX1(1.1%)で, 血清群O157はSTEC全体の85.1%を占め, その他7血清群が分離された。牛のSTEC保菌率は17.5%で, 血清群OUTが検出株の86.9%を占めた。レジオネラの迅速検査法として逆転写反応後のリアルタイムPCR法を検討した結果, 従来のリアルタイムPCR法よりさらに検出感度が向上した。コリネバクテリウム・ウルセランスは, ネコ121検体中5検体(4.1%)から検出された。更に調査を継続して, 感染症の予防に役立つ必要がある。

[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

岡山県下では毎年多数の志賀毒素産生性大腸菌(以下STECと略す)感染症が発生しており, 流行株を把握して感染源・感染経路の究明や発生予防に役立つ目的で, ヒト由来株や食品及び動物から分離した菌株を収集し, 疫学解析を行っている。レジオネラ症は近年浴槽水などを感染源として多数の患者が出ており¹⁾, 感染防止対策として重要な浴槽水等の衛生管理について, その指標として迅速に結果が得られる遺伝子検査法の確立を検討している。また, ジフテリア様毒素を産生するコリネバクテリウム・ウルセランスについては, 患者の感染源と考えられる動物の保菌状況の詳細は不明である。このため, これらの菌種を対象とした調査を継続実施しており, 本報告では平成21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21年度中にヒト, 牛直腸便及び牛糞堆肥から分離されたSTEC株を用いた。

レジオネラの検査および検査法の比較には浴槽水等57検体を, コリネバクテリウム・ウルセランスの保菌調査には犬咽頭スワブ27検体, ネコ咽頭スワブ121検体, 牛健康畜の外耳内部スワブ30検体及び鼻腔内部スワブ35検体, 牛病畜の関節液16検体及び乳汁15検体を用いた。

(2) 各種性状試験

各種性状試験は, 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(ピオメリユ)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ペロ毒素検出用キット(デンカ生研)及びPCR法²⁾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³⁾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)及び逆転写反応後のリアルタイムPCR法⁵⁾(以下qRT-PCR法)を用いて行った。定量性の検討は、既知濃度のレジオネラ菌液を使用してリアルタイムPCR法と逆転写反応後のリアルタイムPCR法で検査を行い、Ct値から検量線を作成して、R²値を求めた。

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21年度のSTEC月別検出状況を、表1に示した。本年度は88株が検出され、5月～10月のうち9月を除いて9.1%～33.0%と高率に検出された。特に7月には33.0%と検出率が最も高く、例年同様夏期に発生が多く6月に腸管出血性大腸菌感染症注意報が、また7月に同警報が発令され、翌年1月に解除された。今年度は例年よりやや分離株数が少ないが、年間を通じてSTECが検出された。

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	3	8	10	29	14	6	9	2	2	2	2	1	88
検出率(%)	3.4	9.1	11.4	33.0	15.9	6.8	10.3	2.3	2.3	2.3	2.3	1.1	

検出されたSTECの血清型・毒素型を、表2に示した。

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	検出率(%)
O103:H2	1	2	2.3
O119:HUT	1	1	1.1
O121:H-	2	1	1.1
O121:H19	2	4	4.5
O145:H-	1	1	1.1
O157:H-	1,2	2	2.3
O157:H7	1	4	4.5
	2	15	17.0
	1,2	53	60.2
O26:H-	1	1	1.1
O26:H11	1	2	2.3
O6:H51	2	1	1.1
O74:H27	2	1	1.1
計		88	

STECの血清型・毒素型は13種類に分類され、このうちO血清群157はSTEC全体の85.1%を占め、O157:H7, STX1,2(60.2%), O157:H7, STX2(17.0%), O157:H7, STX1(4.5%)及びO157:H-, STX1,2(2.3%)が検出された。その他7種類のO血清群の菌が分離されたが何れも検出率は低く、昨年度比較的高率に検出されたO血清群26も本年度は分離株中3.4%と低率であった。

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:H-, STX1,2のPFGE型は1種類であったが、それ以外のO157:H7, STX1,2は33種類、同STX2は12種類、同STX1は4種類で、計50種類のPFGE型に型別され、多種類のPFGE型株による感染であることが示された。O血清群26は分離株数が少なかったため、3種類に型別された。いずれのO血清群においても家族内感染など疫学的に関連がある場合は同一PFGE型又はほぼ同一のPFGEパターンを示した。

牛直腸便及び牛糞堆肥からの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565検体中STECは99検体(17.5%)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30

検体はSTEC陰性であった。検出されたSTECの血清型・毒素型は31種類に分類され、O血清群UT(型別不能：以下OUT)はこのうち83検体(83.8%)を占めた。例

表3-1. STEC O血清群157のPFGE型

血清型	毒素型	PFGE型	株数	備考	
O157:H-	1,2	e266	2	家族内感染事例(2)	
O157:H7	1	e103	1		
		e252	1		
		e261	1		
		e270	1		
	2	d772	1		
		e102	1		
		e104	1		
		e255	1		
		e257	1		
		e270	1		
		e398	1		
		e400	1		
		e402	1		
		e570	1		
		e721	2	家族内感染事例(2)	
		e739	1		
		1.2	c109	2	
			c293	1	
			c47	1	
			c536	2	
	d27		2		
	d501		6	家族内感染事例(3)	
	e106		3	家族内感染事例(3)	
	e107		1		
	e109		1		
	e201		1		
	e219		4		
	e230		1		
	e241		1		
	e243		1		
	e260		1		
	e264		1		
	e265		2		
	e268		1		
	e269		1		
	e270		4		
	e271	1			
	e272	2			
	e273	1			
	e274	1			
e389	1				
e403	1				
e407	1				
e409	1				
e410	1				
e734	1				
e736	1				
e738	1				
e740	1				
計		50	70		

表3-2. STEC O血清群26のPFGE型

血清型	毒素型	PFGE型	株数	備考
O26:H-	1	e142	1	
O26:H11	1	e19	1	
		e59	1	
計		3	3	

年O血清群157の保菌率は低くOUTが高い傾向を示しており、牛のSTEC保菌実態についてさらに継続した調査が必要であると思われる。

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	検出率(%)
		(O157)	(O157)
直腸便	565	99 (0)	17.5 (0)
牛糞堆肥	30	0 (0)	0 (0)
合計	595		

表5. 牛直腸便由来STECの血清型・毒素型

血清型	毒素型	検体数	検出率(%)
O128:H2	1	1	1.0
O133:H-	2	1	1.0
O153:H4	2	1	1.0
O153:HUT	1,2	1	1.0
O26:H11	1	2	2.0
O26:HUT	1	1	1.0
O28ac:HUT	1,2	1	1.0
O28ac:HUT	2	1	1.0
O29:H21	2	1	1.0
O55:H12	1	1	1.0
O6:H34	2	3	3.0
O6:HUT	2	1	1.0
O74:H27	2	1	1.0
O8:H16	2	1	1.0
O8:H19	2	1	1.0
OUT:H-	1	2	2.0
OUT:H-	1,2	1	1.0
OUT:H-	2	37	37.4
OUT:H10	2	1	1.0
OUT:H11	1,2	1	1.0
OUT:H11	2	1	1.0
OUT:H16	2	2	2.0
OUT:H19	1,2	3	3.0
OUT:H19	2	2	2.0
OUT:H2	1	1	1.0
OUT:H2	2	8	8.1
OUT:H21	1,2	4	4.0
OUT:H21	2	9	9.1
OUT:H7	2	1	1.0
OUT:HUT	1,2	2	2.0
OUT:HUT	2	11	11.1
計		104	

*検体数は重複を含む。(%)は陽性検体中の割合

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、図1-1及び1-2と表6、表7-1及び7-2に示した。

遺伝子検査法による定量性については、qRT-PCR法

及びqPCR法の検量線を図1-1及び1-2に示した。それぞれ $Y = -2.988 \cdot \text{LOG}(x) + 24.72$ ($R^2 = 0.990$) 及び $Y = -2.362 \cdot \text{LOG}(x) + 34.09$ ($R^2 = 0.987$) と高い相関が見られた。これらの遺伝子検査法と従来の培養法を用いて浴槽

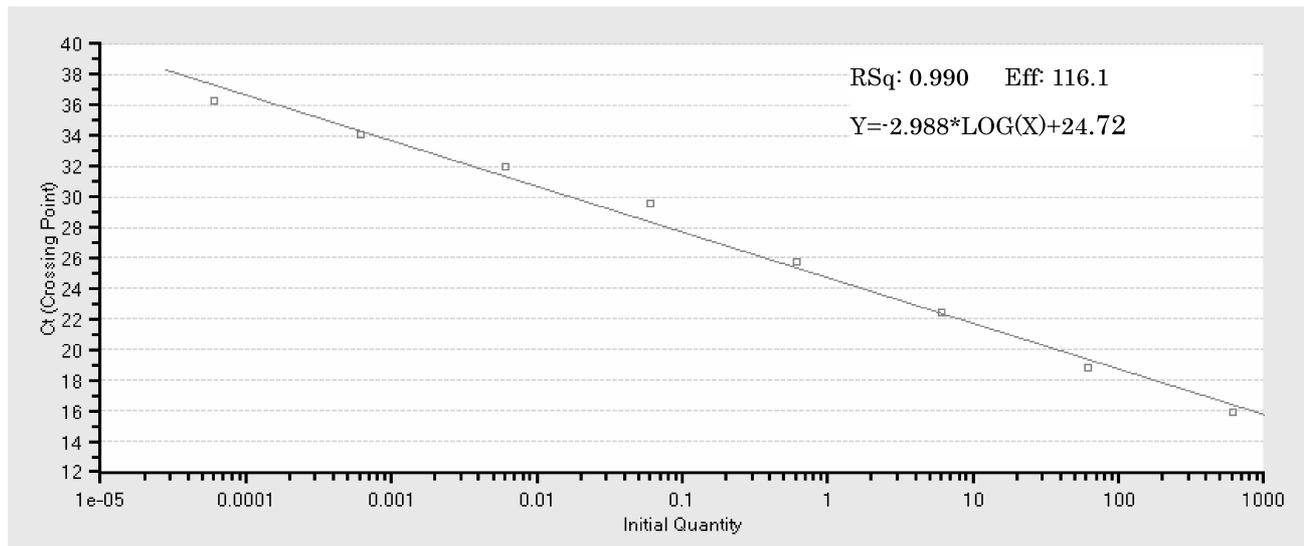


図1-1 検量線 (qRT-PCR法)

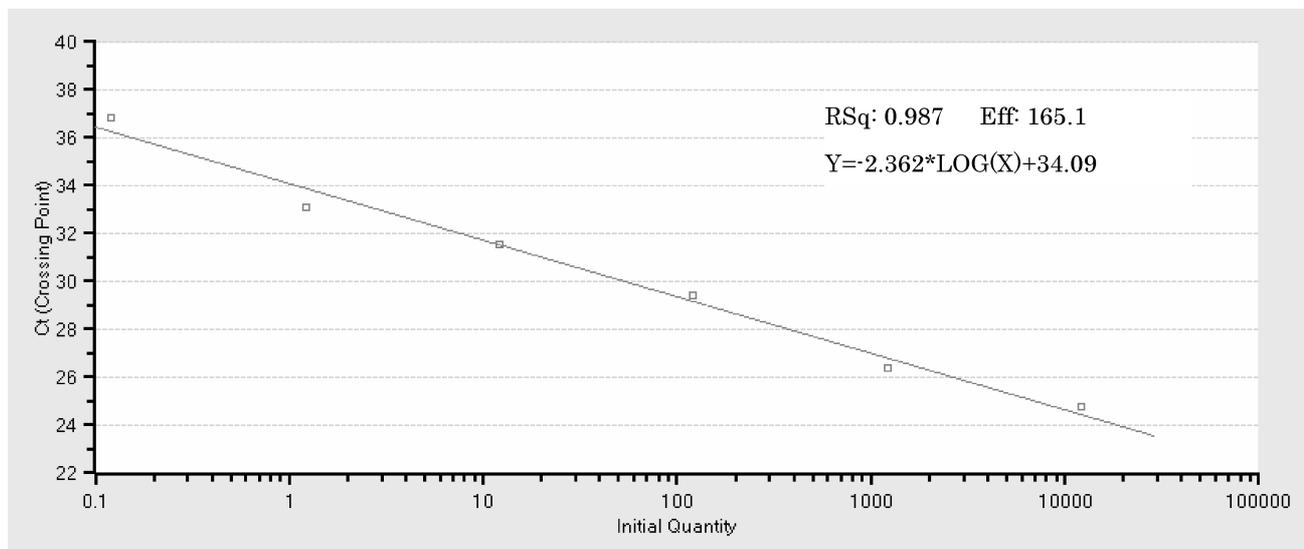


図1-2 検量線 (qPCR法)

表6. 浴槽水の検査法別レジオネラ検出結果

検査法	陽性検体数	検出率(%)	検出菌名(血清群)
培養法	(3)	(5.3)	<i>L. pneumophila</i> (3群、5群、6群、8群、9群、10群)
qPCR法	32 (5)	56.1 (8.8)	
qRT-PCR法	42 (7)	73.7 (12.3)	
計	43		

* (): 10cfu/100ml以上検出
 * * 陽性検体数は重複を含む

水57検体を検査した結果、表6に示すとおり培養法では3検体(5.3%)が陽性となり、遺伝子検査法ではqPCR法が32検体(56.1%)、qRT-PCR法は42検体(73.7%)が陽性となった。また、培養法の基準値(10cfu/100ml)以上の菌数が検出された検体は、qPCR法が5検体(8.8%)、qRT-PCR法は7検体(12.3%)で、いずれの検出率もqRT-PCR法>qPCR法>培養法の順に高かった。培養法で検出されたレジオネラは、*L.pneumophila*血清群3群、5群、6群、8群、9群、10群であった。

表7-1. 検査法別検出結果の比較

①	qPCR+	qPCR-	計
培養+	3 (5.3)	0 (0)	3 (5.3)
培養-	29 (50.9)	25 (43.9)	54 (94.7)
計	32 (56.1)	25 (43.9)	

②	qPCR+	qPCR-	計
qRT-PCR+	31 (54.4)	11 (19.3)	42 (73.7)
qRT-PCR-	1 (1.8)	14 (24.6)	15 (26.3)
計	32 (56.1)	25 (43.9)	

③	qRT-PCR+	qRT-PCR-	計
培養+	3 (5.3)	0 (0)	3 (5.3)
培養-	39 (68.4)	15 (26.3)	54 (94.7)
計	42 (73.7)	15 (26.3)	

* 各検査法毎の検出結果
* *()の数字は検出率

表7-2. 検査法別検出結果の比較

①	qPCR+	qPCR-	計
培養+	3 (5.3)	0 (0)	3 (5.3)
培養-	2(3.5)	52(91.2)	54 (94.7)
計	5 (8.8)	52 (91.2)	

②	qPCR+	qPCR-	計
qRT-PCR+	5(8.8)	2 (3.5)	7 (12.3)
qRT-PCR-	0 (0)	50 (87.7)	50 (87.7)
計	5 (8.8)	52 (91.2)	

③	qRT-PCR+	qRT-PCR-	計
培養+	3 (5.3)	0 (0)	3 (5.3)
培養-	4 (7.0)	50 (87.7)	54 (94.7)
計	7 (12.3)	50 (87.7)	

* 各検査法毎の検出結果のうち、培養法の検出感度(10cfu/100ml)以上を陽性とする
* *()の数字は検出率

表8. 動物からのCorynebacterium検出結果

動物種	採取期間	検体名	検体数	結果		
				検出菌名(検体数)	毒素原生試験	
					PCR法	培養細胞法
イヌ	2009.8~9	咽頭スワブ	27	-	-	-
ネコ	2009.8~12	咽頭スワブ	121	<i>C.ulcerans</i> (5) 4.1% unknown *(4) 3.3%	+	4~16 CD50/25μl 不明
牛(健康畜)	2009.8~2010.1	外耳内部スワブ 鼻腔スワブ	30 35	- -	- -	- -
牛(病畜)	2009.8~11	関節液 乳汁	16 15	- -	- -	- -

*unknown: PCRで陽性であったが、培養からは分離できなかった。

検査法別に結果を比較すると、培養法で陽性の検体は遺伝子検査法でも陽性であり、qPCR法で陽性のほとんどの検体はqRT-PCR法でも陽性であったが、1検体のみqRT-PCR法陰性、qPCR法陽性であった(表7-1)。また、遺伝子検査法で検出された菌数が培養法の基準値(10cfu/100ml)以上の菌数が検出された検体では、培養法で陽性の検体はqRT-PCR法およびqPCR法とも陽性で、またqPCR法陽性検体はqRT-PCR法でも陽性であった(表7-2)。これらのことから、qRT-PCR法はqPCR法に比べさらに高感度で定量性のある検査法であると考えられる。

3.3 コリネバクテリウム・ウルセランスの動物からの検出状況

コリネバクテリウム・ウルセランスの動物からの検出結果を、表8に示した。

コリネバクテリウム・ウルセランスは猫121検体のうち、1地区の猫4検体と他の地区の猫1検体の計5検体(4.1%)から検出され、すべての株はジフテリア毒素原性試験が陽性であった。また、これら以外の4検体でもPCR検査でジフテリア毒素遺伝子の弱い増幅が見られたが、菌は分離できなかった。イヌの咽頭スワブ、牛健康畜の外耳内部及び鼻腔内部のスワブ、牛病畜の乳汁及び関節液からは、菌は検出されなかった。今後は動物の保菌状況についてさらに詳しく調査し、患者からの分離も実施していく予定である。

なお、レジオネラ迅速検査法についての検討は、平成21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)「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」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21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)「動物由来感染症の生態学的アプローチによるリスク評価等に関する研究」の研究班により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) 中嶋 洋, 狩屋英明, 大島律子, 山本真司, 小林正和ら: 老人福祉施設におけるレジオネラ集団感染事例—岡山県, 病原微生物検出情報, 29, 330~331, 2008
- 2) 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
- 3) Pallen, M.J.: Rapid screening for toxigenic *Corynebacterium diphtheriae* by the polymerase chain reaction, J.Clin.Pathol., 44, 1025-1026, 1991
- 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) 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