

岡山県における食中毒及び感染症起因菌の疫学的解析

—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20年度）—

中嶋 洋，狩屋英明，大島律子，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

— 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20年度） —

Epidemiological Studies on Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli*, *Salmonella* and *Corynebacterium ulcerans* in Okayama Prefecture (2008) and Examination of Rapid Detection Methods for *Legionella*

中嶋 洋, 狩屋英明, 大島律子, 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, Hideaki Kariya, Ritsuko Ohata, Kouji Narahara and Katsumi Naka

要 旨

平成20年度に県内で分離された志賀毒素産生性大腸菌(STEC)及びサルモネラの疫学解析と、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・ウルセランスの動物保菌調査を実施した。STECは、ヒト由来株105株中O157:H7, STX2(35.2%), O157:H7, STX1,2(25.7%)及び1(1.0%), O157:H-, STX2及び1,2(各1.0%)と血清群O157がSTEC全体の63.9%を占め、次いでO26:H11, STX1(30.5%)であった。牛のO157保菌率は0.9%で、OUTが81%を占めた。サルモネラは集団事例からS.Enteritidisが検出され、その他8血清型が検出された。レジオネラの迅速検査法としてリアルタイムPCR法による検査法は、検出感度及び定量性ともLAMP法に比べて良かった。イヌ及びウシのコリネバクテリウム・ウルセランス保菌調査では、本菌は検出されなかった。

[キーワード：志賀毒素産生性大腸菌, サルモネラ, 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*, *Salmonella*, *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)感染症とサルモネラ食中毒が発生している。このため、感染源・感染経路の究明や感染症の発生予防に役立つ事を目的として、これらの分離株を収集し食品や動物から検出された菌株とともに疫学解析を行い、流行株の把握に努めている。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⁾、感染防止のために浴槽水等の衛生管理の指標として迅速に検査結果が得られる遺伝子検査法を用いた検査法の確立が急がれている。また、ジフテリア様毒素を産生するコリネバクテリウム・ウルセランスは、過去に県下で患者が発生しているが感染源となりうる動物の保菌状況は不明である。その後も毒素非産生性のジフテリア²⁾が分離されていることから、動物のコリネバクテリウム保菌調査が必要と考えられる。これらの菌種を対象とした本年度の疫学解析や検査法の検討結果を報告する。

2 材料及び方法

(1) 菌株及び検体

県内で平成20年度にヒト、食品、牛直腸便及び牛糞堆肥から検出されたSTEC株及びサルモネラ株を用いた。

レジオネラの迅速検査法には浴槽水等89検体を、コリネバクテリウム・ウルセランスの保菌調査は犬咽頭スワブ14検体、牛外耳内及び肛門周囲の拭き取り各10検体、牛乳房組織及び乳汁各3検体、関節液7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及びサルモネラの性状試験はIDテストEB20(日水)を用い、コリネバクテリウムはApiコリネ(ピオメリユ)により菌の同定を行った。

2) 血清型別

STEC及びサルモネラの血清型別は、病原性大腸

菌免疫血清及びサルモネラ免疫血清(デンカ生研)を用いて実施した。

3) 毒素型別

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)とLAMP法(栄研化学)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LAMP法で検査を行い、Ct値及びTt値からそれぞれ検量線を作成して、R²値を求めた。

3 結果及び考察

平成20年度のSTEC月別検出状況を、表1に示した。

本年度は105株が分離され、平成19年度同様7月～10月にかけて15.2%～31.4%と高率に検出された。このうち特に8月の検出率が高く、夏期には腸管出血性大腸菌感染症注意報が発令された。ここ数年間は、毎年警報あるいは注意報が発令されている状況が続いている。一方、

12月～3月は分離されなかった。

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10種類に分類され、このうちO157はO157:H7, STX2(35.2%), O157:H7, STX1,2(25.7%), O157:H7, STX1(1.0%), O157:H-, STX2及び1,2(各1.0%)が検出されており、STEC全体の63.9%を占めた。これに次いでO26:H11, STX1(30.5%)が検出され、本年度はO157とO26で分離株の94.4%を占めた。O157とO26以外のO血清群は年度により多様であり、本年度はこれら以外にO103, O145, O91が検出されたが、検出率は低かった。

STEC O157及びO26のPFGE型を、表3-1及び表3-2に示した。

PFGE型はO157:H-, STX2及び1,2, O157:H7, STX1が各1種類、O157:H7, STX2が20種類、同STX1,2が18種類に型別され、O26:H11, STX1は13種類に型別された。O157及びO26とも家族内感染事例あるいは同一施設での接触者間の感染事例では多くが同じ血清型・毒素型・PFGE型の株が検出されたが、O157の5事例及びO26の2事例ではPFGE型の異なった菌が分離された。これらは同一事例においてヒト-ヒト感染によりDNAの一部が変異したと考えられるケースであり、疫学解析上の考慮が必要である。

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	4	8	6	16	33	19	16	3	0	0	0	0	105
(%)	3.8	7.6	5.7	15.2	31.4	18.1	15.2	2.9	0.0	0.0	0.0	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	2	1.9
O145:H-	2	2	1.9
	1,2	1	1.0
O157:H-	2	1	1.0
	1,2	1	1.0
O157:H7	1	1	1.0
	2	37	35.2
	1,2	27	25.7
O26:H11	1	32	30.5
O91:H21	2	1	1.0
計		105	

表3-1. STEC O157のPFGE型

血清型	毒素型	PFGE型	備考
O157:H-	2	d622	
	1,2	d430	
O157:H7	2	1	d431
		d671	
		c304	家族内感染事例(2)
		c47	家族内感染事例(2)
		d373	
		d411	家族内感染事例(3)
		d412	家族内感染事例(2)
		d413	家族内感染事例*
		d418	
		d425	
		d426	
		d427	家族内感染事例(2)
		d428	家族内感染事例**
		d429	
		d432	
		d536	家族内感染事例(5)
		d537	
	d544	家族内感染事例(2)	
	d68	家族内感染事例***	
	d70		
	d76		
	1,2	b588	
		b705	
		c293	
		c536	
		d110	
		d111	家族内感染事例****
		d138	
		d148	家族内感染事例(2)
		d167	
		d422	家族内感染事例(2)
		d434	
		d435	
d436		家族内感染事例(3)	
d438			
d539			
d543			
d545			
d80	家族内感染事例*****		

*:d412とd413
 **:d427とd428
 ***:d68とd425
 ****:d111とd544
 *****:d80とd438
 ()内の数字は株数

表3-2. STEC O26のPFGE型

血清型	毒素型	PFGE型	株数	備考
O26:H11	1	d100	1	
		d101	1	
		d102	6	同じ施設から分離(3)、家族内感染事例(3)
		d105	1	
		d135	5	家族内感染事例(5)
		d138	3	家族内感染事例(3)
		d46	6	同じ施設から分離*、家族内感染事例**、家族内感染事例(4)
		d93	1	
		d95	1	
		d97	2	家族内感染事例(2)
		d98	2	家族内感染事例(2)
		d99	1	
		degradation	2	家族内感染事例(2)

*:d46とd101
 **:d46とd102
 ()内の数字は株数

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。

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	221	37 (2)	16.7 (0.9)
牛糞堆肥	21	0 (0)	0 (0)
合計	242		

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	(%)
O121:H19	2	1	2.7
O157:H7	2	2	5.4
O153:HUT	1,2	1	2.7
O165:HUT	1,2	1	2.7
O26:H11	1	3	8.1
O6:H34	2	1	2.7
O8:H19	2	1	2.7
OUT:H-	1	3	8.1
	2	5	13.5
OUT:H11	2	1	2.7
OUT:H18	1,2	1	2.7
OUT:H19	1	1	2.7
	2	3	8.1
	1,2	1	2.7
OUT:H2	2	3	8.1
OUT:H21	2	5	13.5
OUT:HUT	2	3	8.1
	1,2	4	10.8

*検体数は重複を含む。(%)は陽性検体中の割合

牛直腸便221検体についてSTECが37検体(16.7%)から検出され、O157は2検体(0.9%)より検出されたが、牛糞堆肥21検体からは検出されなかった。検出されたSTECの血清型・毒素型は18種類に分類され、O血清群UT(型別不能：以下OUT)はこのうち30検体(81.0%)を占めた。これまでの調査でもOUTの検出率が高くO157保菌率は低い傾向が続いているが、毎年ヒトから100株前後検出されているSTEC株の多くがO157であること

を考えると、より広範囲の検体について継続したSTEC汚染調査や動物の保菌調査を実施する必要があると思われる。

県内のサルモネラの分離状況は、表6に示した。

表6. サルモネラ分離状況

由来	血清型	検体名	検体数
集団発生事例	S.Enteritidis	患者	5
		若鶏レバー	1
散发事例	S.Agona	患者	1
	S.Berta		1
	S.Braenderup		1
	S.Enteritidis		1
	S.Infantis		2
	S.Montevideo		2
	S.Saintpaul		1
	S.Thompson		1
型別不能	1		
収去品	S.Infantis	若鶏砂肝	1
		ミンチ肉(豚)	1
	S.Schwarzengrund	若鶏砂肝	1
計			20

集団事例の患者5名と若鶏レバーからS.Enteritidisが検出され、散发事例の患者1名からも検出された。S.Infantisは患者2名と収去された若鶏砂肝と豚ミンチ肉各1検体から検出され、別の若鶏砂肝からはS.Schwarzengrundが検出された。サルモネラは鶏検体から多く検出されていることから、養鶏施設や食鳥処理場などの施設における十分な衛生管理が必要であり、そのための指導や衛生対策の強化が重要であると思われる。患者由来のサルモネラは9血清型が検出されており、他種類の血清型菌による食品汚染が示唆された。

以上のことから、STEC及びサルモネラによる感染については、今後も継続した調査と疫学解析により感染の予防と感染拡大の防止に努めていく必要がある。

一方、呼吸器感染症の原因菌であるレジオネラとコリネバクテリウム・ウルセランスについて、レジオネラは迅速検査法として遺伝子検査法のリアルタイムPCR法とLAMP法の検討を行い、結果を図1と図2及び表7に示した。

遺伝子検査法による定量性について、リアルタイムPCR法の検量線は図1のように $Y = -3.951 \cdot \text{LOG}(x) + 40.26$ ($R^2 = 0.988$)で、高い相関が見られた。LAMP法は R^2 値が0.9728でリアルタイムPCR法に比べて少し低かったが、良好な値であった。両法による浴槽水の検査結果(表7)

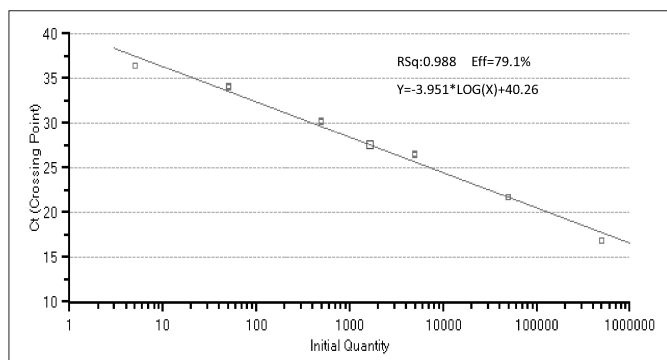


図1. Standard Curve (qPCR法)

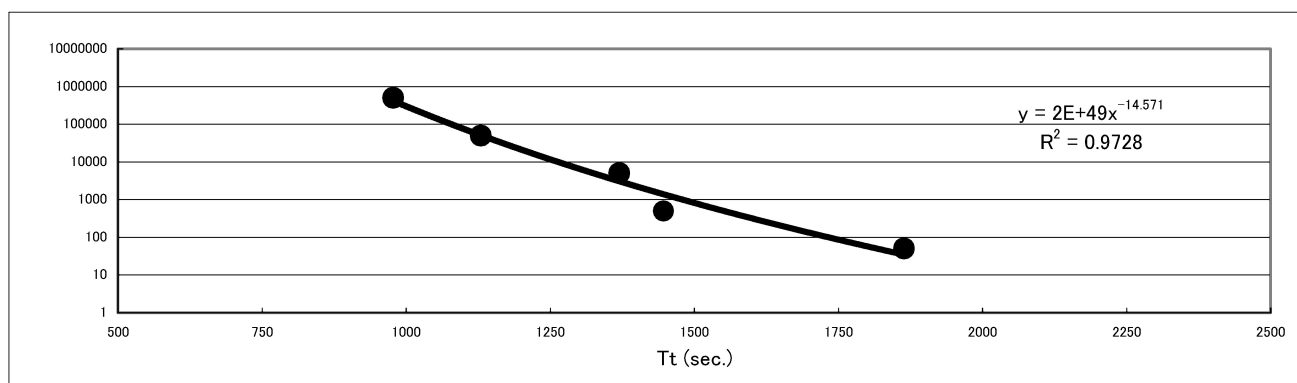


図2. Standard Curve (LAMP法)

表7. 検査法相互のレジオネラ属菌検出結果の比較

LAMP 法	リアルタイム PCR 法	
	+	-
+	18 (20.2)	0 (0)
-	21 (23.6)	50 (56.2)

から、LAMP法に比べてリアルタイムPCR法の方が検出感度が高いことが示された。特にリアルタイムPCR法は感度、定量性の面からも迅速検査法として利用可能と考えられた。これらの遺伝子検査法を用いた検査では、残留塩素濃度が十分で管理が良くできている浴槽でも死菌の遺伝子を検出できるため、潜在的なレジオネラの存在が確認でき、衛生管理のための重要な指標となるものとする。

コリネバクテリウム・ウルセランスのイヌ及び牛の保菌調査結果は、表8～10に示した。

イヌの咽頭スワブ14検体、牛外耳内及び肛門周囲の拭き取り各10検体、牛乳房組織及び乳汁各3検体、関節液7検体について培養法とPCR法によりコリネバクテリウム・ウルセランスの検出を試みたが全例陰性であった。

表8. コリネバクテリウム・ウルセランス検査結果

番号	採取年月日	種類	性別	成犬・子犬の別	結果	
					PCR	培養
1	H20.7.10	雑種	オス	成犬	—	—
2	H20.7.10	雑種	オス	成犬(1年未)	—	—
3	H20.7.10	ビーグル	メス	成犬	—	—
4	H20.7.10	雑種	メス	成犬	—	—
5	H20.7.17	シーズー	メス	成犬	—	—
6	H20.7.17	雑種	オス	成犬	—	—
7	H20.7.17	雑種	オス	成犬	—	—
8	H20.7.17	雑種	オス	成犬	—	—
9	H20.10.29	雑種	メス	子犬	—	—
10	H20.10.29	雑種	オス	成犬	—	—
11	H20.10.29	雑種	メス	成犬	—	—
12	H20.10.29	雑種	オス	成犬	—	—
13	H20.10.29	雑種	オス	成犬	—	—
14	H20.10.29	キャバリア	メス	成犬	—	—

表9. 牛健康畜のコリネバクテリウム・ウルセランス検査結果

番号	採取年月日	検体				備考
		拭き取り(外耳内)		拭き取り(肛門周囲)		
		PCR	培養	PCR	培養	
1	H20.7.18	—	—	—	—*	C.glucuronolyticum
2	H20.7.18	—	—	—	—	
3	H20.7.18	—	—*	—	—*	C.argentoratense
4	H20.7.18	—	—*	—	—	C.urealyticum C.glucuronolyticum
5	H20.7.18	—	—*	—	—**	*C.glucuronolyticum **C.urealyticum
6	H20.10.28	—	—	—	—*	C.glucuronolyticum
7	H20.10.28	—	—	—	—	
8	H20.10.28	—	—	—	—*	C.glucuronolyticum
9	H20.10.28	—	—	—	—	
10	H20.10.28	—	—	—	—	

表10. 牛病畜のコリネバクテリウム・ウルセランス検査結果

番号	採取年月日	診断病名	検体						備考
			乳房組織		乳汁		関節液		
			PCR	培養	PCR	培養	PCR	培養	
1	H20.7.8	関節炎	—	—	—	—			
2	H20.7.8	関節炎					—	発育なし	膝関節液
3	H20.7.8	急性乳房炎	—	—	—	—			
4	H20.7.9	関節周囲炎					両方—	発育なし	飛節と膝関節液
5	H20.7.10	関節周囲炎					—	発育なし	膝関節液
6	H20.7.15	急性乳房炎	—	発育なし	—	発育なし			
7	H20.7.15	関節炎					—	発育なし	飛節
8	H20.7.15	関節炎					両方—	発育なし	飛節と膝関節液
9	H20.7.15	関節炎					両方—	発育なし	飛節と膝関節液
10	H20.7.17	ダウンー症候群					—	—	飛節

しかし、過去に患者が発生していることから、更に検体数を増やして調査を継続していく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20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20年度厚生労働科学研究費補助金(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) 中嶋 洋, 狩屋英明, 大島律子, 小倉 肇, 長岡義晴ら: 患者血液から毒素非産生性 *C.diphtheriae* が分離された1症例について, 病原微生物検出情報, 28, 201~202, 2007
- 3) 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
- 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