

## 【調査研究】

## 感染症及び食中毒起因菌の汚染実態に関する研究

Investigation of Contamination Concerning Infectious Disease and Food Poisoning Related Bacteria

狩屋英明, 河合央博, 森本晃司, 仲 敦史, 中嶋 洋

KARIYA Hideaki, KAWAI Hisahiro, MORIMOTO Koji, NAKA Atsushi, NAKAJIMA Hiroshi

## 要 旨

レジオネラ, サルモネラ, エルシニアによる感染症の感染源となる食品等の汚染状況や流行株の汚染実態を把握するため調査を行った。レジオネラについて県内の道路水溜り47か所の汚染状況を調査したところ, その汚染率は53.8% (35/65検体) で189の分離株が得られ, レジオネラ症に関連する汚染源としての可能性が推測された。また, 令和元年5月に, 国内では岡山県でのみ分離されているレジオネラ遺伝子型sequence type 93による患者(11例目)が発生し, 患者が使用した加湿器の水を調べたが, レジオネラは分離されず, 感染源は不明だった。サルモネラについて, 県南3系列のスーパーで販売されている国産生食肉の汚染状況を調査したところ, 牛肉0% (0/9), 豚肉0% (0/18), 牛豚ミンチ0% (0/11), 鶏肉7.5% (3/40) の汚染率であった。前回の調査と同様に, 今回の調査においても, 鶏肉の汚染が認められた。エルシニア感染症の発生実態把握のため, 患者血清のエルシニア抗体価を測定した結果, エルシニア症を疑う患者29名のうち抗体価の上昇がみられたのは15名で, 11名は陰性であり, 3名は判定保留となった。

[キーワード: レジオネラ, 水溜り, サルモネラ, エルシニア, 抗体価]

[Key words: *Legionella*, Puddles, *Salmonella*, *Yersinia*, Antibody titer]

## 1 はじめに

レジオネラ症, 腸管出血性大腸菌(以下「STEC」という。), サルモネラ等の感染症について, 患者の増加リスクに大きく寄与する感染源となる食品等の汚染状況や流行株の汚染実態を把握することは, 感染症や食中毒の発生予防及びまん延の防止のため重要と考えられる。そこで, 令和元年度は, レジオネラの県内道路水溜り等での汚染状況, ヒト由来STEC株の収集と血清型別等(ヒト由来STECについては別報にて報告), サルモネラの県南での市販国産生食肉等の汚染状況を調査した。また, 川崎病との関連が疑われるものの感染実態が不明であるエルシニア感染症の調査のため, 疑い患者の血清抗体価を測定した。なお, エルシニア抗体価調査は, 平成30年度に当センターの倫理委員会に諮り, 承認を得て実施した。

## 2 材料及び方法

## 2.1 検体

レジオネラは, 県内のアスファルト道路上の水溜り47か所の汚染状況を調査した。また, 県内医療機関で分離されたレジオネラ1検体の遺伝子型別等を調査するとともに, 感染源の特定のために, 当該患者の使用した

加湿器の水を検体とした。サルモネラの検査は, 岡山県南3系列のスーパーで販売された国産生食肉(牛肉9検体, 豚肉18検体, 牛豚ミンチ11検体, 鶏肉40検体), 市販国産ハチミツ3検体, ニホンヤモリのふん便5検体, 鳥のふん便10検体(ヒヨドリ9検体, サギ1検体), 野ネズミの腸内容物6検体(農業被害により駆除した野ネズミ), タヌキのふん便3検体を用いた。エルシニアの抗体価測定は, 全国の医療機関の小児科等の外来患者又は入院患者のうち, エルシニア感染症又は川崎病との鑑別のため, 抗体価測定の依頼があった29名の患者血清について実施した。

## 2.2 検査法

各菌種の検査は, 以下の方法で実施した。

## 2.2.1 レジオネラ

## 2.2.1.1 道路上の水溜り等からの分離

定法<sup>1)</sup>に準じて, GVPN培地等を用いて実施し, 分離株がレジオネラ属菌であることは, 血液寒天培地に発育しないこと, また斜光法における特徴的な外観構造を有することで確認した。水溜り検体は100 mL, 加湿器の水は約8 mLをそれぞれ, 直接塗抹及びろ過濃縮法による分離試験を行った。

### 2.2.1.2 PCR法によるレジオネラ菌種の同定

16S rRNA 遺伝子を標的としたレジオネラ属菌を特異的に検出するPCR法を実施した。また、陽性を示した株については、*mip* 遺伝子を標的とした *Legionella pneumophila* を特異的に検出するPCR法を実施した。

### 2.2.1.3 sequence-based typing

レジオネラ株の sequence-based typing (以下「SBT」という。)法を用いた sequence type (以下「ST」という。)型別は、国立感染症研究所細菌第一部に依頼して実施した。

## 2.2.2 サルモネラ属菌

### 2.2.2.1 分離

平成31年4月から令和2年1月まで分離試験を行った。食肉、サギのふん便、タヌキのふん便及び野ネズミの腸内容物はそれぞれ1g、ヒヨドリのふん便は複数をもとめた1g、ニホンヤモリのふん便は複数をもとめた0.2g~0.3gを使用し、定法<sup>2)</sup>に従いサルモネラ分離試験を行った。前増菌にBPW (OXOID)、選択増菌にRV培地 (OXOID)、分離培地にDHL寒天培地 (日水製薬)又はX-SAL寒天培地 (日水製薬)を使用し、TSI寒天培地 (日水製薬)及びLIM培地 (栄研化学)で性状を確認し、同定キットで菌種同定し、血清型別試験を行った。なお、食肉等の食品以外の検体では前増菌は行わなかった。

### 2.2.2.2 血清型別

サルモネラ免疫血清「生研」(デンカ生研)及びサルモネラ相誘導用免疫血清「生研」(デンカ生研)を用いて血清型別試験を実施し、Kauffmann-Whiteの様式により血清型を確認した。

### 2.2.2.3 薬剤感受性試験

アンピシリン (ABPC)、カナマイシン (KM)、セフメタゾール (CMZ)、セフトキシム (CTX)、セフェピム (CFPM)、セファゾリン (CEZ)、イミペネム (IMP)、メロペネム (MEPM)、ナリジクス酸 (NA)、ST合剤、ノルフロキサシン (NFLX)、ホスホマイシン (FOM)、クロラムフェニコール (CP)、レボフロキサシン (LVFX)、ストレプトマイシン (SM)、テトラサイクリン (TC) の計16剤について、センシ・ディスク (日本ベクトン・ディッキンソン株式会社)を用いて寒天平板拡散法 (ディスク法)で行った。

## 2.2.3 エルシニアの抗体価測定

患者血清を56℃、30分間非働化後、PBSで10倍希釈し、これを2倍段階希釈した希釈系列を、使用する抗原数と同数作成した。抗原液として、当センターが保有する *Y.pseudotuberculosis* 血清群1a, 1b, 1c, 2a, 2b, 2c,

3, 4a, 4b, 5a, 5b, 6, 7, 10, 15株と *Y.enterocolitica* 血清群O3, O5, O8, O9株を25℃、2日間培養し、菌体をPBSに浮遊して121℃で1時間加熱し、洗浄後にマックファーランドNo.0.7の濃度に調整したものを使用した。各希釈系列にそれぞれ1種類の抗原液を同量ずつ加え、混和して50℃で2時間反応後、室温で1晩静置後に判定し、1:160以上を陽性とした。

## 3 結果及び考察

### 3.1 レジオネラ

県内の道路の水溜り47か所を調べたところ、レジオネラ汚染率は53.8% (35/65検体)であった。検体はアスファルト道路上の水溜りであり、アスファルト上の水溜りは重要な環境中の汚染源であるとの指摘もあり<sup>3)</sup>、今後も継続して、水溜り由来菌と患者由来株との関連を調査する必要があると考えられた。

令和元年5月に届出された患者の肺胞洗浄液から *Legionella pneumophila* 血清群3のST93が分離された。この遺伝子型は本県特有の型<sup>4)~6)</sup>であり、今回が11例目であった。患者が使用していた加湿器の水を検査したが、レジオネラは分離されず、感染源は不明であった。国内では本県でしか検出されなかったことのない患者由来のST93の感染源究明のため、継続した周辺環境調査の必要性があるものと考えられた。

### 3.2 サルモネラの食肉等の汚染状況

岡山県南で販売される市販国産生食肉のサルモネラ汚染状況を調べた。豚肉18、牛肉9、牛豚ミンチ11、鶏肉40の計78検体を調べた。豚肉及び牛肉並びに牛豚ミンチからはサルモネラは検出されず、国産鶏肉3検体 (3/40 7.5%)から *Salmonella* Schwarzengrund (O4:d:1,7) が2株、S.Yovokome (O8:d:1,5) が1株分離された。以前

表1 サルモネラ汚染率

検体	検査数	サルモネラ陽性数	汚染率(%)
牛肉	9	0	0
豚肉	18	0	0
鶏肉	40	3 ※	7.5
牛豚ミンチ肉	11	0	0
ハチミツ	3	0	0
ニホンヤモリふん便	5	0	0
ヒヨドリふん便	9	0	0
サギふん便	1	0	0
野ネズミ腸内容物	6	0	0
タヌキふん便	3	0	0

※2検体S. Schwarzengrund陽性、1検体S. Yovokome陽性

の調査（平成29年4月～平成30年4月）では35検体の国産鶏肉から5検体5株（5/35 14.3 %）のサルモネラが分離され、全てS.Schwarzengrundであった。今回も鶏肉で高率に検出され、衛生管理の重要性が認識された。

分離されたS.SchwarzengrundはSM及びTCに耐性の1株とKM及びNAに耐性の1株であり、薬剤感受性パターンが異なっていた。これらは別々の系列のスーパーで販売されていた鶏肉から分離されており、菌株の由来は異なるものと思われた。食品由来のサルモネラはSM及びTCに耐性の株が多いことが知られており、今回の調査でも耐性を示したものが1株あった。

表2 S.Schwarzengrundの薬剤感受性パターン

薬剤	菌株No.	
	170	182
アンピシリン	S	S
カナマイシン	R	S
セフメタゾール	S	S
セフォタキシム	S	S
セフェピム	S	S
セファゾリン	S	S
イミペネム	S	S
メロペネム	S	S
ナリジクス酸	R	S
ST合剤	S	S
ノルフロキサシン	S	S
ホスホマイシン	S	S
クロラムフェニコール	S	S
レボフロキサシン	S	S
ストレプトマイシン	S	R
テトラサイクリン	S	R

S：感受性 R：耐性

ニホンヤモリ、ヒヨドリ、サギ、タヌキのふん便及び野ネズミの腸内容物からはサルモネラは検出されなかった。爬虫類が人のサルモネラ症に関与することも示されており<sup>7)~10)</sup>、今後は宿主の属性も考慮しつつ、より多くの検体を調査する必要があると考えられた。

### 3.3 エルシニアの抗体価

エルシニア症又は川崎病を疑う患者29名のうち抗体価の上昇がみられたのは15名（*Y.pseudotuberculosis* 14名、*Y.enterocolitica* 1名）で、11名は陰性であり、3名は3種類以上の抗原液に凝集したため判定保留となった。原因不明の川崎病との鑑別やエルシニア症の感染実態把握のために、今後も継続した調査を実施していく予定である。

## 謝 辞

本調査の実施に際して、レジオネラ患者関連検体を分与していただきました倉敷中央病院臨床検査技術部細菌ウイルス検査室の藤井寛之先生と大森章恵先生に、また、レジオネラのSBT法によるSTの型別解析を行っていただきました国立感染症研究所の前川純子先生に深謝いたします。その他、各種の菌株の分与や検体採取に御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) 国立感染症研究所：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
- 2) 公益社団法人日本食品衛生協会：食品衛生検査指針微生物編，269～283，2015
- 3) Kanatani J, Isobe J, Kimata K, Shima T, Shimizu M, et al.: Close Genetic Relationship between *Legionella pneumophila* Serogroup 1 Isolates from Sputum Specimens and Puddles on Roads, as Determined by Sequence-Based Typing, *Appl. Environ. Microbiol.*, 79(13), 3959-3966, 2013
- 4) 中嶋 洋, 檀上博子, 河合央博, 大島律子：感染予防対策に向けたヒト及び環境等における感染症起因菌の調査（平成27年度）②岡山県内のレジオネラの疫学調査と小児科受診患者等のエルシニア抗体保有調査について，岡山県環境保健センター年報，40，57-61，2016
- 5) 西山明宏, 石田 直, 興紹陽平, 小西聡史, 坪内和哉ら： *Legionella pneumophila* serogroup 3による呼吸器感染症の4症例，*感染症誌*，85，373-379，2011
- 6) 中嶋 洋, 大島律子, 河合央博, 前川純子, 倉 文明ら：患者由来 *Legionella pneumophila* 血清群3 sequencetype 93 の疫学調査—岡山県，病原微生物検出情報（IASR），34(6)，164-165，2013
- 7) 亀山光博, 矢端順子, 富永 潔, 野村恭晴, 泉谷秀昌：山口県内のペットショップで販売されている爬虫類のサルモネラ保有状況及び薬剤感受性，*日獣会誌*，66，331-336，2013
- 8) 森田幸雄：世界的に注目される食中毒微生物の最先端研究-生態学的視点を中心に- 世界の畜産，環境，ヒトをめぐるサルモネラの最新動向，*日食微誌*，31(3)，148-152，2014
- 9) 土屋祐司, 秦 なな, 加藤和子, 山本安子, 小泉偉左夫ら：市内の保育施設で見られた *Salmonella*

Poona 散発事例について－浜松市，病原微生物検出  
情報（IASR），31(4)，105-107，2010

- 10) 長野則之，小穴愼二，長野由紀子，荒川宜親：ミシ  
シッピーアカミミガメ（ミドリガメ）との関連が強  
く疑われた小児重症サルモネラ感染症の2症例，病  
原微生物検出情報（IASR），26(12)，342-343，2005