

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 25 年度)

中嶋 洋, 大島律子, 河合央博, 檜原幸二*, 井上 勝*, 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

【調査研究】

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 25 年度)

Investigation of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli*, *Legionella* and pathogenic *Yersinia* in the human and the environmental samples for prevention of transmission
(FY2013)

中嶋 洋, 大島律子, 河合央博, 檜原幸二*, 井上 勝*, 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, Hisahiro Kawai, Kouji Narahara*,

Masaru Inoue*, Katsumi Naka** (Department of Bacteriology)

* Department of Pediatrics, Okayama Red Cross General Hospital

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

要 旨

県内で多発する志賀毒素産生性大腸菌 (STEC) 感染症およびレジオネラ症の予防のため、ヒト、動物、食品および環境材料について検査を行い、同時に県内で分離された STEC、レジオネラの疫学調査を実施した。STEC は、ヒト由来株 76 株中、O 血清群 157 が 59.2% で最も検出率が高かった。牛由来検体の分離株は、すべて O 血清群 157 以外であった。県内でヒトから分離された *L.pneumophila* 血清群 3 のうち、本県に地域特異的な遺伝子型 ST93 株の感染源究明のため、浴槽水等 140 検体の調査と分離株の疫学解析を行ったが、感染源は究明できなかった。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、患者の 11.6% に抗体価の上昇が見られた。

[キーワード：志賀毒素産生性大腸菌，レジオネラ，エルシニア，疫学，抗体価]

[Key words : shiga toxin-producing *Escherichia coli*, *Legionella*, *Yersinia*, epidemiology, antibody titer]

1 はじめに

岡山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の感染源・感染経路の究明と発生予防を目的として、疫学調査を実施している。平成 25 年度は、収集したヒト由来株、食品、動物および浴槽水等から分離した菌株を用いて疫学解析を行った。また、感染実態が不明であるエルシニア感染症の調査のため、患者血清の抗体価を測定したので、併せて報告する。

2 材料及び方法

2.1 菌株及び検体

STEC の検査は、平成 25 年度にヒトから分離された 76 株と、牛直腸便 423 検体及び牛ホルモン 43 検体を用いて行った。

レジオネラの検査には浴槽水等 140 検体と、保健所などが浴槽水等から分離したレジオネラ属菌 79 株および患者由来株 1 株を用いた。

エルシニアの抗体価測定は、全国の病院小児科等の受診あるいは入院患者のうち、エルシニア感染症の疑いあるいは川崎病との鑑別のため、抗体価測定の依頼があった 147 名の患者血清 284 検体について実施した。なお、抗体価調査は、当センターの倫理審査委員会に諮り、承認を得て実施した。

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 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。

2.2.2 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)及びレジオネラ免疫血清(デンカ生研)を用いて実施した。

2.2.3 STECの毒素(STX)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¹⁾により実施した。

2.2.4 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(PFGE)法は、寺嶋ら²⁾のプロトコールにより実施し、DNAパターンによる型別(PFGE型別)は、国立感染症研究所に依頼して実施した。レジオネラのPFGE法は、常らの改良法³⁾により実施した。

2.2.5 IS-printing systemによる疫学解析

STEC O血清群(以下「O」という。)157株の疫学解析は、IS-printing System(TOYOBO)を用いて実施した。

2.2.6 Sequence-Based Typing (SBT)

レジオネラ株のSBT法を用いた型別(Sequence Type(ST))^{4), 5)}は、国立感染症研究所に依頼して実施した。

2.2.7 エルシニアの抗体価測定

エルシニアの抗体価測定は、患者血清を56℃、30分

間非働化後、生理食塩水で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。抗原液は、当センターが保有する*Y.pseudotuberculosis*(以下「Yp」という。)(血清群1a, 1b, 2a, 2b, 3, 4a, 4b, 5a, 5b, 6)株と*Y.enterocolitica*(以下「Ye」という。)(血清群O3, O5, O8, O9)株を25℃、2日間培養し、菌体を生理食塩水に浮遊してマックファーランドNo 0.5の濃度に調整した。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℃、1晩凝集反応を行って翌日判定し、1:160以上を陽性とした。

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25年度にヒトから分離されたSTECの月別検出状況を、表1に示した。

ヒト由来STEC 76株は2月を除くすべての月で検出され、例年と同様に7月～9月の夏季に13.2%～23.7%と高率に検出された。

ヒト由来STECの血清型・毒素型を、表2に示した。

12種類の血清型・毒素型株が検出され、このうちO157は45株(59.2%)、O26は20株(26.3%)で、これらが全体の85.5%を占めた。また、これら以外にO103, O111, O121, O146, O163, O58, O91, OUT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	5	5	7	18	14	10	4	6	4	2	0	1	76
(%)	6.6	6.6	9.2	23.7	18.4	13.2	5.3	7.9	5.3	2.6	0.0	1.3	

7月の患者1名からO157:H7 VT2とO111:H- VT1が検出

表2 ヒトから検出されたSTECの血清型・毒素型

	毒素型	株数	(%)
O103:H2	1	3	3.9
O111:H-	1	2	2.6
O121:H19	2	1	1.3
O146:H-	2	1	1.3
O157:H-	1	1	1.3
	1,2	2	2.6
O157:H7	1	1	1.3
	2	14	18.4
	1,2	27	35.5
O163:H19	2	1	1.3
O26:H-	1	1	1.3
O26:H11	1	19	25.0
O58:H28	1	1	1.3
O91:H14	1	1	1.3
OUT:H21	2	1	1.3
計		76	

O157 及び O26 の PFGE 型を、表 3-1 及び表 3-2 に示した。

O157 は 37 種類、O26 は 16 種類に型別され、O157 : H7 と O26 : H11 は多種類の PFGE 型に分類された。いずれの血清型でも、同一家族内や同じ保育園に通う児童など、疫学的に関連性のある分離株間において、僅かな遺伝子の変異が頻繁に見られることが示された。一方、

O157 株について実施した IS-printing system による解析結果は、疫学的関連のある株間では同一の結果を示し、PFGE 型に比べより疫学情報と一致する結果であった。本法は、手技が PFGE 法に比べて簡単で、短時間に結果を得ることができることから、事例発生時における分離株の分子疫学解析にスクリーニング的に利用することが、有効であると思われる。

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	g359	1		
	1, 2	i443	1		
		i444	1		
O157:H7	1	i445	1		
	2	g501	2	家族C由来株	
		h327	1	家族E由来株	
		i189	1		
		i435	3	家族D由来株	
		i447	1	家族C由来株	
		i448	1	家族C由来株	
		i449	1	家族E由来株	
		i450	1		
		i602	1		
		i613	1		
		k12	1		
		d483	2	家族A由来株	
		h426	1		
		h727	1		
	i253	1			
	i266	1			
	i399	1			
	i434	2	同一飲食店で喫食歴あり		
	i436	1			
	i437	2	家族I由来株		
	i439	1			
	i440	1			
	i441	1			
	i442	1			
	i446	1			
	i532	1			
	i606	1			
	i607	3	家族L由来株:1、家族M由来:2(同一保育園①児童)		
	i608	1	家族L由来株		
	i609	1	家族L由来株(同一保育園①児童)		
	i614	1			
	i615	1			
	k11	1			
	計			45	

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	i11	1	家族B由来株
O26:H11	1	i114	1	保育園②
		i131	2	家族H由来株
		i132	1	家族B由来株
		i133	1	家族G由来株
		i134	1	家族G由来株
		i135	1	家族J由来株
		i136	1	家族J由来株
		i137	1	
		i138	1	
		i139	3	家族F由来株
		i140	1	
		i141	1	
		i142	1	保育園②
		i217	2	家族K由来株
		i218	1	
		計		

牛直腸便及び牛ホルモンから検出されたSTECの血清型・毒素型を、表4に示した。

牛直腸便423検体中46検体(10.9%)、牛ホルモン43検体中1検体(2.3%)からSTECが検出されたが、ヒトから高率に検出されるO157及びO26は検出されず、多くはOUT(O血清群別不能)であった。この結果は、過去の調査結果と同様の傾向を示しており、同じ状況が継続していることが確認された。

表4 牛直腸便由来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	O6:H34	2	1	0.2
	O6:HUT	2	2	0.5
	O8:H19	1,2	1	0.2
	O74:H7	2	1	0.2
	O103:HUT	2	1	0.2
	O124:H19	2	1	0.2
	O153:HUT	2	1	0.2
	O153:HUT	1,2	2	0.5
	O153:H-	1,2	1	0.2
	OUT:H11	2	5	1.2
	OUT:H19	2	2	0.5
	OUT:H19	1,2	2	0.5
	OUT:H2	1	2	0.5
	OUT:H21	2	3	0.7
	OUT:H41	1,2	1	0.2
	OUT:H7	2	1	0.2
	OUT:HUT	2	3	0.7
OUT:HUT	1,2	5	1.2	
OUT:H-	1	1	0.2	
OUT:H-	2	10	2.4	
	計		46	
牛ホルモン	OUT:H21	2	1*	2.3
	OUT:HUT	2	1*	2.3
	計		1	

*:同一検体から検出

3.2 浴槽水等のレジオネラ汚染調査

浴槽水等140検体について実施したレジオネラ汚染調査結果を、表5に示した。

培養法により、浴槽水128検体中30検体(23.4%)、原水・給湯水11検体中1検体(9.1%)からレジオネラが検出され、ジャグジープール水1検体からは検出されなかった。浴槽水からは*L.pneumophila*(以下[*Lp*]という。)血清群1, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 11, 12, 14, UTが、原水・給湯水では*Lp*血清群1が検出され、浴槽水は多様な血清群の*Lp*で汚染されていることが確認された。

保健所の検査で浴槽水等から検出されたレジオネラ79株を収集し、血清群別を実施した結果を、表6に示した。

浴槽水由来株は、*Lp*血清群1, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10, 12, UTと、*L.anisa*, *L.micdadei* およびレジオネラ属菌で、当センターの調査と同様に、多様な血清群および菌種が検出された。シャワー水由来株は*Lp*血清群5と6、ジャグジー水由来株は*Lp*血清群3と10、プール水由来株は*Lp*血清群1, 3, 10、冷却塔水由来株は*Lp*血清群1, 3, 13であった。

浴槽水等から分離された*Lp*血清群3のうち、過去に分離された株も含めた131株について、PFGE法による解析を行った結果を、表7に示した。

表5 検体別レジオネラ検出状況(平成25年度)

検体名	検体数	陽性検体数	検出率(%)	検出菌種及び血清群(検体数)*	
浴槽水	内湯	101	25	24.8	<i>L. pneumophila</i> SG1(9), 3(5), 5(4), 6(6), 7(1), 8(1), 10(4), 11(1), 12(1), UT(1)
	露天風呂	27	5	18.5	<i>L. pneumophila</i> SG1(3), 3(2), 4(2), 5(1), 6(2), 10(1), 14(1)
原水・給湯水	11	1	9.1	<i>L. pneumophila</i> SG1(1)	
ジャグジープール水	1	0	0.0		
計	140	31	22.1		

*:重複を含む。 UT:O血清群別不能

表6 保健所等分離レジオネラ株(平成25年度)

検体名	菌株数	検出菌種及び血清群(株数)
浴槽水	65	<i>L. pneumophila</i> SG1(10), 3(11), 4(6), 5(6), 6(9), 8(1), 9(3), 10(12), 12(1), UT(2) <i>L.anisa</i> (1), <i>L.micdadei</i> (2), <i>Legionella</i> spp.(1)
シャワー水	3	<i>L. pneumophila</i> SG5(1), 6(2)
ジャグジー水	2	<i>L. pneumophila</i> SG3(1), 10(1)
プール水	3	<i>L. pneumophila</i> SG1(1), 3(1), 10(1)
冷却塔水	6	<i>L. pneumophila</i> SG1(3), 3(2), 13(1)
計	79	

UT:O血清群別不能

表7 県内で分離された*L.pneumophila* SG3株のPFGEパターン数

由来	菌株数	バンドパターン数*
浴槽水	91	51
原湯	3	3
ジャグジー水	3	2
プール水	8	4
プールのろ過水	5	2
フローミル水	9	1
冷却塔水	3	3
患者	9	1
計	131	61

*検体間の重複を含む

表8 エルシニア抗体価測定結果(H25年度)

菌種	患者数	検体数	陽性患者数	陽性率 (%)	血清群 (陽性患者数)
<i>Y. pseudotuberculosis</i>	147	284	15	10.2	1(2), 2(3), 3(1), 4(2), 5(3), 6(4)
<i>Y. enterocolitica</i>			2	1.4	03(1), 08(1)

PFGEパターンは61パターンに分類され、多数の株が分離された浴槽水では、最も多い51パターンに分類された。一方、本年度県内のレジオネラ症患者1名から分離された*Lp*血清群3の株を含め、今まで県内で分離された患者由来*Lp*血清群3のPFGEパターンはすべて一致し、同じST93に型別された。これらの株は他地域では分離されておらず、本県でのみ地域特異的に継続分離されている。これらのことから、同一感染源からの感染が示唆されたが、他の浴槽水等由来株のPFGEパターンやSTとは異なっており、さらに多様な検体について、継続した汚染実態調査を実施する必要があると考える。

3.3 エルシニア抗体価調査

エルシニア感染症疑いあるいは川崎病との鑑別のため、小児科受診患者あるいは入院患者の血清抗体価を測定した結果を、表8に示した。

患者147名の血清284検体についてエルシニア抗体価を測定した結果、15名(10.2%)の*Yp*(血清群1, 2, 3, 4, 5, 6)に対する抗体価が1:160以上の上昇が見られ、2名(1.4%)は*Ye*(血清群O3, O8)に対する抗体価が1:160以上に上昇していた。本調査は、原因不明の川崎病との鑑別や感染実態が不明なエルシニア感染症の状況を明らかにするため、過去の検体も含めて本年度より3年間の調査を実施して、さらにデータの集積と解析を行っていく予定である。

なお、レジオネラの調査については、平成25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)「レジオネラ検査の標準化及び消毒等に係る

公衆浴場等における衛生管理手法に関する研究」の研究班による調査の一環として実施したものである。また、エルシニア抗体価調査の一部は、姫路赤十字病院小児科との共同研究の検体を使用した。

謝 辞

本調査の実施に際して、STECの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、泉谷 秀昌先生、レジオネラの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、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) 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
- 3) 常 彬, 前川 純子, 渡辺 治雄：レジオネラを解析するパルスフィールド・ゲル電気泳動(PFGE)法の改良. IASR 2008, 29, 333-334.
- 4) Gaia V, Fry NK, Afshar B, Lück 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

- 5) Ratzow S, Gaia V, Helbig JH, Fry NK, Lück PC. :
Addition of neuA, the gene encoding N-acylneuraminate
cytidyl 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