

図1. 細菌性赤痢の推定感染地域国内の年齢群別報告数、2003-2005

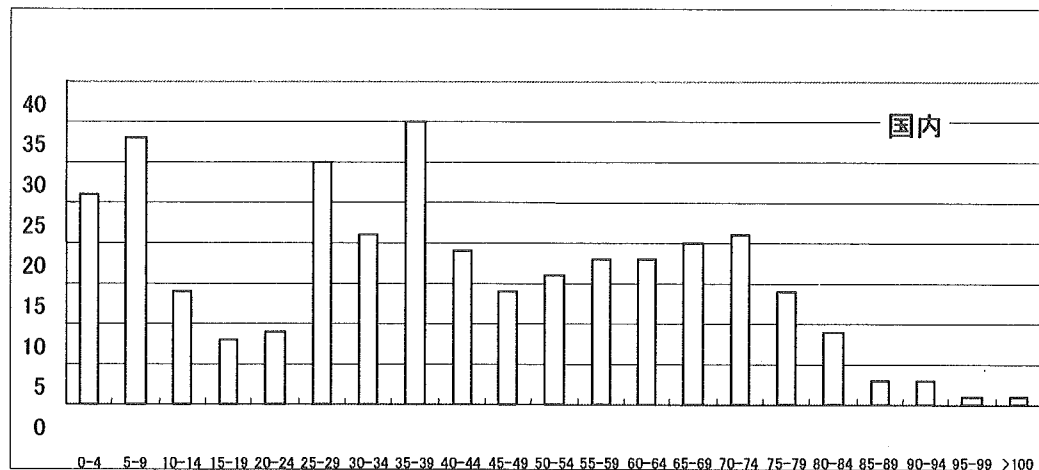


図2. 細菌性赤痢の推定感染地域海外の年齢群別報告数、2003-2005

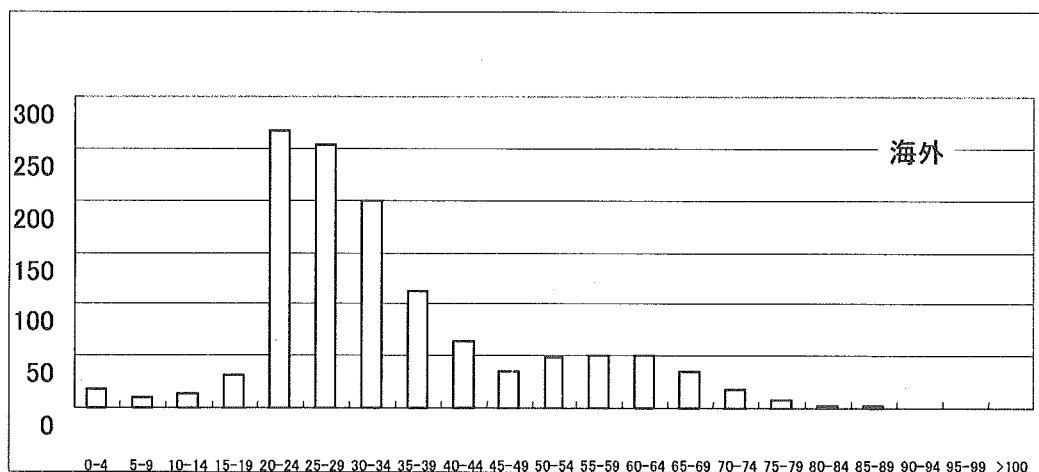


表6. 国内コレラの月別発生数

月	症例数	%	備考
Jan.	4	6.7	
Feb.	0	0	
Mar.	0	0	
Apr.	1	1.7	
May	0	0	
Jun.	4	6.7	
Jul.	10	16.7	7~9月の3ヶ月のみで 全症例の71.6%を占 める。
Aug.	20	33.3	
Sep.	13	21.7	
Oct.	5	8.3	
Nov.	1	1.7	
Dec.	2	3.3	
Total	60	100	

表7. 潜在的な曝露因子

曝露	あり	%	なし	不明
魚介類の生食 <sup>1</sup>	36/53 <sup>2</sup>	68	13	4
同：マグロ	17/53	32	22	14
同：イカ	7/53	13	28	18
エビの喫食(生食を含む)	10/53	19	32	11
井戸水の使用	1/53	1.9	27	25

1. 発病日及びその前三日間の生食
2. 無症候者は、発病日がないので分母から除外。

表8. 潜在的な危険因子(患者側の要因)

	症例数	%
胃切除歴	10/65	15
慢性腎不全	4/65	6.1
同：透析導入	2/65	3.1
副腎皮質ステロイド剤の服用	1/65	1.5

表9. 食中毒事件

No	時期	症例数	原因食品等
1	'01年8月	3	仕出し弁当
2	'02年8月	3 (無症2例を含む)	アジの生食
3	'02年8月	3	仕出し弁当
4	'02年9月	2	宴会料理 (スッポン?)

表 10. CSPI に報告された(推定)原因食品

カテゴリー(発生数)	原因食品(発生数)	発生月
<b>赤痢</b>		
Seafood (11)	Raw oysters(3), Other fish, Fish soup, Fried shrimp; house salada, Fish sticks, Shell primarily raw, <b>Smoked salmon</b> , Shrimp scampi, Scallops	1, 4-6, 9
Produce (26)	Guacamole(2), <b>Tomato</b> , Lettuce(2); potato chips, Salsa(4), Green onions, Salada(5), Mashed potatoes, Honeydew melon, Fresh fruites; onion dip, <b>Dip(3)</b> , Mesclum mix; salada, Basil, Parsley, Pico de gallo, Homemade dip, Strawbewrries on a flan	1-12
Egg (5)	Egg/poultry sandwich, Raw egg milkshake; eggs, Sour cream, <b>Cheese; lettuce; tomatoes</b>	3-5, 9-10
Breads & Bakery (2)	Muffins; doughnuts, Pumpkin pie	3, 10
Beverage	Coffee; cream puff	6
Game	Moose soup	9
Mutli-ingredient food (21)	Hero sandwich (sus.), <b>Salada(10)</b> , Sushi, Coleslaw, Multiple foods(3), Ethnic style, Self-service item, Dips, Hot sauce	1, 3-9, 11-12
Poultry (12)	Chicken sandwich, Baked chicken, Chicken nuggets/fingers(3), Chicken(4), <b>Chicken salada(2)</b> , Chicken curry	1, 4-5, 7, 9, 11-12
Beef (6)	Beef burrito; beef taco, Hamburger(2), Beef, Beef fajita, Beef enchilada; beef taco	4, 6-7, 9, 11
Other Meats (2)	<b>Deli meat</b> , Meat pizza	1, 12
Both (5)	FDA USDA 管轄の食品を含む	7
<b>腸チフス</b>		
Dairy	Cheese sauce	8
Produce	Fruit	2
Sea Food	Raw oyster	11
<b>コレラ</b>		
Sea Food (8)	Raw oyster (2), Baked crab, Crab meat(2), Crab, Raw reef fish; water, <b>Seafood newburg</b>	1, 4-5, 8, 10, 12
Produce	Fruit, bread, cheese	12
Beverages	Fresh frozen coconut milk	8

原因食品の太字は 100 件を超える事例

「食品由来の2類感染症のリスクアセスメントモデル構築に関する研究」  
細菌性赤痢，コレラにおける食品—人感染，人—人感染の疫学調査  
分担研究者 相楽裕子 横浜市立市民病院（感染性腸炎研究会）

## 1 目的

2類感染症として類型化されている疾患のうち、食品媒介性に発生するものとして、細菌性赤痢、コレラ、腸チフス、パラチフスが挙げられる。いずれも国外由来事例が多いが、食品由来と推定される国内事例も発生している。細菌性赤痢に関しては、生カキの摂食による国内事例が発生、この事例では、輸入の加熱加工用カキが生食用として流通、主に韓国産のものが混入していた。国内事例ではないが、機内食が原因となった食中毒事例も発生している。コレラに関しては毎年のように国内事例が報告されている。腸チフス、パラチフスについては潜伏期間が2週間前後と長い為、散発事例での原因検索は不可能に近い。

細菌性赤痢やコレラが国内で発生する要因の一つに食品や水が原因となることが考えられる。それらの食品の汚染が海外由来なのか国内由来なのか実態は不明である。本研究では、感染性腸炎研究会において取り扱った細菌性赤痢とコレラの国内事例を対象に行った調査を通して食品由来2類感染症のリスクアセスメントを行い防御対策のポイントを検討したい。

## 2 方法

今回は、2000年1月から2004年12月までの5年間に感染性腸炎研究会に属する東京都及び13政令指定都市の感染症指定医療機関に入院した細菌性赤痢とコレラの国内事例について発生状況を調査し、一部の事例ではretrospectiveに推定原因調査を行った。

## 3 結果

### 1) 入院状況と検出血清型

細菌性赤痢の入院数は240、うち国内例は37(15.4%)、国内例の血清型は*S.dysenteriae* 1、*S.flexneri* 10、*S.boydii* 0、*S.sonnei* 24、不明2で

あった。コレラの入院数は26、うち国内例は5(19.2%)、すべて血清型O1でコレラ毒素産生性であり、生物型Eltor Ogawa 2、Eltor Inaba 3であった。

### 2) 年齢・性別(表1)

細菌性赤痢の入院総数240例では20代が圧倒的に多く、その多くは国外由来例であった。国内例37(15.4%)は全年齢層に分布し、20歳未満と60歳以上では国内例が半数を占めた。コレラの入院総数は26例で、20代と50代(各8例)に多く、国外由来例が多数を占めていた。国内例は若年層にはみられず、40代以上であった。総数では細菌性赤痢では女性が、コレラでは男性が多かったが、国内例では性別に差はみられなかった。

### 3) 原因が推定された国内事例(表2)

国内例のうち、細菌性赤痢6例、コレラ1例について飲食物との関連が疑われた。細菌性赤痢1例は家庭内二次感染が疑われた。赤痢菌の血清型は*S.flexneri* 1、*S.sonnei* 6であった。推定原因とされた飲食物は海鮮丼2、すし1、刺身1、イクラ醤油漬1、ベトナム料理1であった。コレラの国内例1例では居酒屋での生鮮魚介類喫食が原因と推測された。いずれも外食であったが、保健所の調査では特定されていない。

## 4 考察

細菌性赤痢、コレラともに国外由来例が圧倒的に多く、国内例は前者で10数%、後者で20%弱であった。細菌性赤痢の場合には家庭内や集団生活内の二次感染があるため、国内例のどこまでが飲食物由来なのか分からないが、コレラの場合は二次感染がほとんどないため、国内例はほぼ飲食物由来と推定される。原因が推測された事例では細菌性赤痢もコレラも外食した生鮮魚介類の関与が疑われた。

今後は国内例の喫食調査を徹底することによりリ

スクアセスメントを行うことが適切と思われる。

研究協力者：山下和予（国立感染症研究所感染症情報センター）、大西健児（東京都立墨東病院）、角田隆文（東京都立荏原病院）、今村顕史（東京都立駒込病院）、滝沢慶彦（札幌市立札幌病院）、山陰敬（仙台市立病院）、深山牧子（東京都立豊島病院）、寺野隆（千葉市立青葉病院）、小花光夫（川崎市立川崎病

院）、水野芳樹（名古屋市立東市民病院）、清水恒広（京都市立病院）、阪上賀洋（大阪市立総合医療センター・感染症センター）、春田恒和（神戸市立中央市民病院）、藤井肇（広島市立舟入病院）、青木知信（福岡市立こども病院・感染症センター）、岡田薫（北九州市立医療センター）

表1 細菌性赤痢とコレラの入院状況

年齢層	0～	10～	20～	30～	40～	50～	60～	計	男	女
細菌性赤痢 総数	8	15	132	51	9	8	17	240	106	134
国内例	4	8	9	5	1	2	8	37	18	19
コレラ 総数	1	1	8	2	2	8	5	26	16	10
国内例	0	0	0	0	1	2	2	5	3	2

表2 原因が推測された国内事例

年齢	性	発病年月日	分離菌	情報
30	男	2000/4/13	<i>S.sonnei</i>	妻が2月にベトナム旅行
37	女	2000/8/26	<i>S.sonnei</i>	8/25 回転すし、夫も発病（菌陰性）
29	女	2001/11/16	<i>S.sonnei</i>	11/15 ベトナム料理
28	男	2001/12/11	<i>S.flexneri</i> 2a	12/9 法事で刺し身
31	女	2002/9/29	<i>S.sonnei</i>	9/27 海鮮丼
28	女	2004/6/19	<i>S.sonnei</i>	6/17 海鮮丼
66	男	2004/9/5	<i>S.sonnei</i>	9/4 しめ鯖、イクラ醤油漬
54	男	2005/4/30	<i>V.cholerae</i> O1 Eltor Ogawa	4/27 居酒屋で刺し身

研究課題名： 食品由来の2類感染症のリスクアセスメントモデル構築に関する研究 (H17・新興-013)

分担研究課題： 日本国内での食品由来腸チフスパラチフスの発生に関する調査

分担研究者 渡辺治雄 国立感染症研究所 副所長・細菌第一部 部長

研究協力者 廣瀬健二 国立感染症研究所 細菌第一部 第二室 室長

## 研究要旨

腸チフス・パラチフスは食品や水を介してヒトからヒトに感染する。1960年代までは日本国内でも飲食物や水を介した腸チフス・パラチフスの発生がみられていた。近年では、上下水道が整備され衛生状態がよくなったため日本国内での腸チフス・パラチフスの発生は激減した。しかし、依然として海外の発展途上国では旅行者が食品や水を介して腸チフスパラチフスに感染している。本研究では、日本国内において食品・水を介した腸チフス・パラチフスの発生が現在でも日本にあるかを調査することが目的である。調査の結果、食品が原因とは言い切れないが疑わしい例があったため、その菌株を解析した結果を報告する。

### A. 研究目的

腸チフス・パラチフスは食品や水を介してヒトからヒトに感染する。1960年代までは日本国内でも飲食物や井戸水を介した腸チフス・パラチフスの集団発生がしばしばみられていた。1970年代以降、上下水道が整備され衛生状態がよくなったため日本国内での腸チフス・パラチフスの発生は激減した。しかし、依然として海外の発展途上国では上下水道が整備されていないため衛生状態が悪く、旅行者が食品や水を介して腸チフスパラチフスに感染している。本研究では、現在でも日本国内において食品・水を介した腸チフス・パラチフスの発生があるかを調査することが目的である。海外渡航歴のない腸チフス・パラチフス患者が日本国内で少ないながら発生するが、そのようなケースに食品・飲料水が関与しているケースがあるかもしれない。海外渡航歴のない腸チフス・パラチフスの発生に注目し調査をする。

### B. 研究方法

腸チフス・パラチフス患者から分離されたチフス菌・パラチフス A 菌は地方衛生研究所を通じて国立感染症研究所細菌第一部に送付される。これ

らの菌株が送付される際には、患者情報、症状、海外渡航歴などが菌株送付書として添付されている。それから渡航歴のない事例はさらに管轄保健所に問い合わせ、患者の行動記録をもとに腸チフス・パラチフスの感染に食品の関与を疑うかどうかを調べる。その結果、疑いがあればその菌株のフェージ型、パルスフィールド電気泳動を行い菌株の解析を行う。

### C. 研究結果

2005年1月から12月までに分離されたチフス菌・パラチフス A 菌32株のうち渡航歴のない事例は腸チフス8例であった。これらに関し管轄保健所に電話し患者の発症前の行動記録から食品が関与しているかどうかを検討した結果、食品の関与が疑われる事例はなかった。さらに過去7年間の菌株送付書を調査した結果2002年に2例食品の関与を疑う記述がある送付書が見つかったので、2例の菌株をフェージ型別、パルスフィールド電気泳動で解析を行った。下記にそれら2つの事例の詳細を記す。

#### 事例1

大阪府堺市衛生研究所より平成14年5月14日に腸チフス患者より分離した菌株を受領した。菌株番号 020028 I.Y. 15歳 男性 高専学生 海外渡航歴無し  
発病年月日平成13年12月下旬、診定年月日平成14年1月12日  
住所 和歌山県G市  
スーパーチェーン店のA支店で牡蠣を購入し加熱して喫食した旨、管轄保健所より連絡があった。

#### 事例2

菌株番号 020029 M.K. 12歳 男性 中学生 渡航歴無し  
発病年月日平成13年12月下旬、診定年月日平成14年2月28日  
住所 大阪府S市  
スーパーチェーン店のB支店で牡蠣を購入し加熱して喫食した旨、管轄保健所より連絡があった。

これら2名の患者は、発病前（平成13年12月上旬）にスーパーチェーン店のA支店とB支店（同じスーパーチェーンの異なる支店）で牡蠣（加熱調理用、宮城県産）を購入し水炊きなどにして食べたことが確認されている。1つの事例では患者自身が牡蠣を食べてから調子が悪くなったという話をしていたことが確認されている。2支店間の距離は直線距離で約90キロメートルであった。患者2人に交友関係はない。2名より分離された菌株のフェージ型はともに46型であった。PFGEの結果、2名より分離された菌株のBlnIの切断パターン（図1、レーン1, 2）は一致した。過去に分離された菌（関連無し）のBlnIの切断パターンと比較した結果、レーン12の菌株（フェージ型E1, 渡航先タイ）の切断パターンなど非常に類似したパターンが見られた。

#### D. 考察

過去5年間の渡航歴のない腸チフス・パラチフス事例の調査を行った結果2例の食品の関与が疑われる事例が見つかった。これら2つの事例はと

もに牡蠣の喫食歴があり、その内1事例では患者自身は牡蠣が感染源ではないかと疑っていた。2つの事例とも牡蠣は同じスーパーチェーン店で購入されており、仕入れ先が同じと考えられた。菌株の解析より2つの株は同じフェージ型46型、PFGEでのBlnI切断パターンは同じであった。46型はそれほど頻繁に分離されるフェージ型ではないため、おそらく2つは同一の菌株であると考えられる。

スーパーチェーンが一括して仕入れた牡蠣に関西地方のA支店、B支店で販売し、それを購入した患者が同じチフス菌に汚染された牡蠣を食べて腸チフスを発症したことが疑われる。しかしながら、牡蠣そのものからのチフス菌の分離がない限り、牡蠣が原因であるという確証はない。また、牡蠣がチフス菌に汚染されていたとしたらもっと大きな集団事例となることが考えられ、わずか2人のみの発症では本当に牡蠣がチフス菌に汚染されていたかはわからない。しかしながら、患者自身が牡蠣の関与を疑ったため保健所の担当者が国立感染症研究所に連絡があった。40年ほど前には、広島などで牡蠣が原因で腸チフス・パラチフスの発生がみられていた。衛生環境が改善されてからは牡蠣による腸チフス・パラチフスの発生はほとんどなくなっている。

#### E. 結論

海外渡航歴のない腸チフス・パラチフスはほとんどの場合感染源が全くわからない。非常に稀ではあるが、このように食品を介した事例も考えられるため今後海外渡航歴のない腸チフス・パラチフスについては調査の必要があると思われる。また、食品が関与しているかどうかを調査するには専ら患者の記憶に頼るしかないため患者からの聞き取り調査や喫食調査を慎重に行う必要があると考えられる。

#### E. 研究発表

1 論文発表

廣瀬健二

腸チフスパラチフスの対策について

日本医事新報 4235号 94-95, 2005年 日本医事新報社

廣瀬健二 伊藤健一郎 渡辺治雄

チフス菌・パラチフス A 菌

日本臨床 63巻増刊7号 187-190 2005 日本臨床社

2 学会発表

日本国内で分離されたチフス菌・パラチフス A 菌の  
薬剤感受性の傾向

廣瀬健二、渡辺治雄、相楽裕子  
感染性腸炎研究会総会、東京、2005

腸チフスパラチフスの治療に関する調査 2000 から  
2003年

相楽裕子 廣瀬健二 渡辺治雄  
感染性腸炎研究会総会、東京、2005

ナリジクス酸耐性チフス菌・パラチフス A 菌の日本

国内における分離状況

廣瀬健二 田村和満 泉谷秀昌 高井信子 渡辺治雄

第 79 回日本感染症学会総会 名古屋、  
2005. 4. 14-15

腸チフスパラチフスの治療に関する調査 2000 から  
2003年

相楽裕子 大西健児 角田隆文 今村顕史 小花光夫  
大羽健一 廣瀬健二 渡辺治雄

第 79 回日本感染症学会総会 名古屋、  
2005. 4. 14-15

F. 知的所有権取得状況

1 特許取得

なし

2 実用思案

なし

3 その他

なし



図1 牡蠣の喫食による感染を疑う患者から分離されたチフス菌のパルスフィールド電気泳動の写真



PFGE 番号	菌株番号	分離地	牡蠣の喫食	渡航先	ファージ型
1	020028	堺	牡蠣食べた	なし	46
2	020029	堺	牡蠣食べた	なし	46
3	020030	福岡	関連なし	なし	D2
4	020031	福岡	関連なし	韓国	D2
5	020025	下関	関連なし	なし	56
6	010025	大阪	関連なし	韓国	E14
7	010028	大阪	関連なし	韓国	E1
8	990029	福岡	関連なし	韓国	E1
9	990060	埼玉	関連なし	韓国	E1
10	990062	福岡	関連なし	韓国	E1
11	980057	大阪	関連なし	韓国	DVS
12	010024	タイ	関連なし	タイ	E1
13	980022	東京	関連なし	インド	46
15	970026	東京	関連なし	インド・ネパール	46
16	970092	長野	関連なし	インド・タイ	46
17	970108	千葉	関連なし	インド	46

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）

食品由来の2類感染症のリスクアセスメントモデル構築  
に関する研究（H17-新興-13）

食品における赤痢菌検出法の標準化と感度の向上

牧野壮一

国立大学法人帯広畜産大学・大動物特殊疾病研究センター・教授

研究協力者；

川本恵子（国立大学法人帯広畜産大学・大動物特殊疾病研究センター・助教授）

門田修子（国立大学法人帯広畜産大学・大動物特殊疾病研究センター・大学院生）

武士甲一（国立大学法人帯広畜産大学・畜産学部・教授）

研究要旨 赤痢菌は、グラム陰性桿菌で細菌性赤痢感染症の原因菌であり二類感染症の1つに指定されている。細菌性赤痢感染症は海外感染例がほとんどであったが、近年は国内感染例が増加傾向にある。その原因として、食品媒介感染が考えられている。しかし、発症菌数が10個以下と少ない事から、食品からの迅速かつ正確な赤痢菌検出は食の安全上非常に重要である。そこで、本研究では、食品からの赤痢菌検出法の標準化を図り、感度の向上を目指した。2001年に西日本で韓国産輸入カキが原因の細菌性赤痢感染症患者が発生し、厚生労働省により参考試験法が配布されているが、本年度は、この参考法に変更を加え、高感度で迅速な方法に改良した。具体的には、再現性のあるサンプル処理方法、リアルタイムPCRの導入、不純物を除去する迅速かつ簡便な方法の導入により、1個以上の菌数がサンプルに存在すれば24時間以内に検出が可能である方法に改良した。本方法の実用性についての検討が今後必要である。

#### A. 研究目的

現在、食中毒事例において汚染食品の特定が果たされているのは約3割と非常に低い。それには様々な理由が挙げられるが、主として簡便で正確な検出法が無い事や、生きているが培養できない（VBNC）細菌の存在が同定を困難にしていると考えられる。この事から従来 of 微生物学的検出法に加え、更に感度の高い新たな検出法の開発が求められている。

細菌性赤痢感染症は海外感染例がほとんどであったが、近年は発展途上国などへの渡航歴のない国内感染例が増加傾向にある。この事から感染源としては食品が考えられ、実際に2001年西日本で韓国産輸

入カキが原因となった細菌性赤痢感染症患者が発生した。

本菌は、グラム陰性桿菌で細菌性赤痢感染症の原因菌であり「感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律」で二類感染症に指定されている。大腸菌とのDNA間の相同性は85%以上と非常に高く、同一菌種内に含まれる値であるが、医学上の重要性と習慣により大腸菌属から独立している。発症菌数が10個以下と少ないため食品からの迅速かつ正確な赤痢菌検出は食の安全上非常に重要であるが、検出法は未だ確立されていない。そこで、本研究では赤痢菌を標的とし、食品から赤痢菌

を検出する方法を確立し、その標準化と感度の向上を図った。

具体的には、輸入カキが原因の細菌性赤痢感染症が発生した際、2001年に厚生労働省が各都道府県に配布した参考試験法に若干の変更を加えた方法を新規検出法とし、食品からの赤痢菌検出を試みた。

## B. 研究方法

### 1. 使用菌株および培地

当研究室の保管株である *Shigella flexneri* YSH6000、*S. sonnei* を Trypticase-Soy Broth (TSB, Becton Dickinson) にて一晚培養し、滅菌済み生理食塩水で希釈して使用した。組換え Rpf の作製には腸管出血性大腸菌 O-157 の集団食中毒事例株 (堺株) 由来のゲノム DNA を用いた。

### 2. 赤痢菌検出法

図 1 に本研究で用いた検出法と厚生労働省配布の参考試験法の相違点を示す。試験品として市販のカキ 25 g を使用した。滅菌済みのストマッカーバッグに試験品と 0.5 µg/ml ノボピオシン (DIFCO) と Tween 80 (関東化学) を 0.75 ml 添加したシゲラブロス (OXOID) 225 ml を入れ、ストマッカー (AES Labotiore) により 30 秒間ストマッキングした。そこに、 $10^3$ 、 $10^5$ 、 $10^7$ 、 $10^8$  倍にそれぞれ希釈した菌液を加えて密閉し、ガスを逃す穴を数箇所開け、 $44^{\circ}\text{C}$  で一晚培養した。陰性対照には菌を添加しなかった。

培養菌液 2 ml から MORA-EXTRACT DNA 抽出キット (極東製薬) を用いて添付の説明書に従い、ゲノム DNA を抽出した。赤痢菌および腸管侵入性大腸菌病原因子遺伝子の検出用プライマーとして *invG*、*ipaH*、16S rDNA (タカラバイオ) を使用し、ライトサイクラー (Roche) にてリアルタイム PCR を行った。PCR の条件を Table 1 に示す。反応終了後に 1% アガロースゲルにて電気泳動を行い、PCR 産物のサイズを確認した。

### 3. 一般細菌数

試験品と 9 倍量の滅菌済み phosphate-buffered saline (PBS) をストマッカーバッグに入れ 30 秒間ストマッキングした。原液および  $10^2$ 、 $10^3$  倍に希釈した物を desoxycholate hydrogen sulfide lactose agar (DHL, 栄研) と Trypticase soy agar (TSA), 各 3 枚に 100 µl 塗抹後、好気条件下にて  $37^{\circ}\text{C}$  で一晚培養し、コロニー数を計測した。

## C. 研究結果

### 1. 新規検出法

新規検出法により、 $10^8$  倍希釈した菌液を接種したサンプルで PCR 後の電気泳動から、*invG*、*ipaH*、16S rDNA 3 つのプライマーが検出された。即ち、理論上 1 個以下の菌数が存在していれば、検出が可能であると考えられる。又、冷凍カキから *Shigella sonnei* を検出した例を参考に、二段階培養法を生カキと冷凍カキで実施したところ、二段階培養法は冷凍カキに使用したほうが検出感度は良好であった。

### 2. 一般細菌数

本研究に使用したカキの一般細菌数は  $2.0 \times 10^3$  /g であり、大腸菌数は  $1.5 \times 10^3$  /g であった。無菌のヤングコーンに大腸菌を接種し検出感度を調査した例では、 $1.2 \times 10^5$  CFU/g 接種サンプルから PCR 法にてバンドが検出されているが、カキは消化管に細菌叢があるとされ、無菌状態とは考え辛い。又、食材中の高いタンパク質濃度などにより検出感度が低いと考えられており、食材からの DNA 抽出に検討が求められていたが、新規検出法でジルコニアビーズ破砕法キットを使用した事により問題解決に至ったと思われる。よって、本検出法はこの一般細菌や大腸菌存在下においても殆ど検出に影響を受けず、高感度であると考えられる。

## D. 考察

本研究では、食品からの赤痢菌の検出法を確立する事・赤痢菌の VBNC について知見を得る事を目的とした。細菌性赤痢感染症の原因食材と考えられるが、検出が困

難とされてきたカキを試験品とし、厚生労働省配布の参考試験法を変法した物を新規検出法とした。本試験法で *S. flexneri* を植菌し、菌検出を確認したところ  $1.7 \times 10^{-1}$  CFU/ml の菌数で検出が確認できた。

*S. sonnei* をカキに植菌し、厚生労働省配布の参考試験法にて検出感度を調査した他の研究結果によると、PCR 法で検出できた菌数は  $3.4 \times 10^2$  CFU/g であった。このことから、新規検出法は計算上 1 個以上の菌数が存在していれば検出が可能であり、高感度であると考えられる。

VBNC は代謝活性や病原性を保っており、生きていながらもかかわらず増殖しない細菌の状態の事である。VBNC 状態の細菌による食品の汚染は食中毒感染症を蔓延させる恐れがあるため、公衆衛生上潜在的に危険であり、VBNC の解明は食の安全上非常に重要であると考えられる。又、赤痢菌の発症菌数が少ない理由に VBNC 菌の存在も考えられることから、赤痢菌の VBNC について今後の検討が必要であり、今回の高感度な検出法により VBNC 状態の赤痢

菌の生態について明らかにすることが可能となるであろう。

#### E. 結論

赤痢菌は、発症菌数が 10 個以下と少ない事から、食品からの迅速かつ正確な赤痢菌検出は食の安全上非常に重要であるが、本研究で示した新規検査法により、1 個以上の菌数が存在していれば検出が可能となった。

#### F. 健康危険情報

特に無い。

#### G. 研究発表

1. Shuko Monden, Sou-ichi Makino, Keiko Kawamoto. Detection Method of *Shigella* from oyster by PCR. The Asian Conference on Diarrhoeal Diseases and Nutrition (ASCODD), March, 2006.

#### H. 特許出願状況

特にない

図 1. 厚生労働省参考法と本研究における改良点

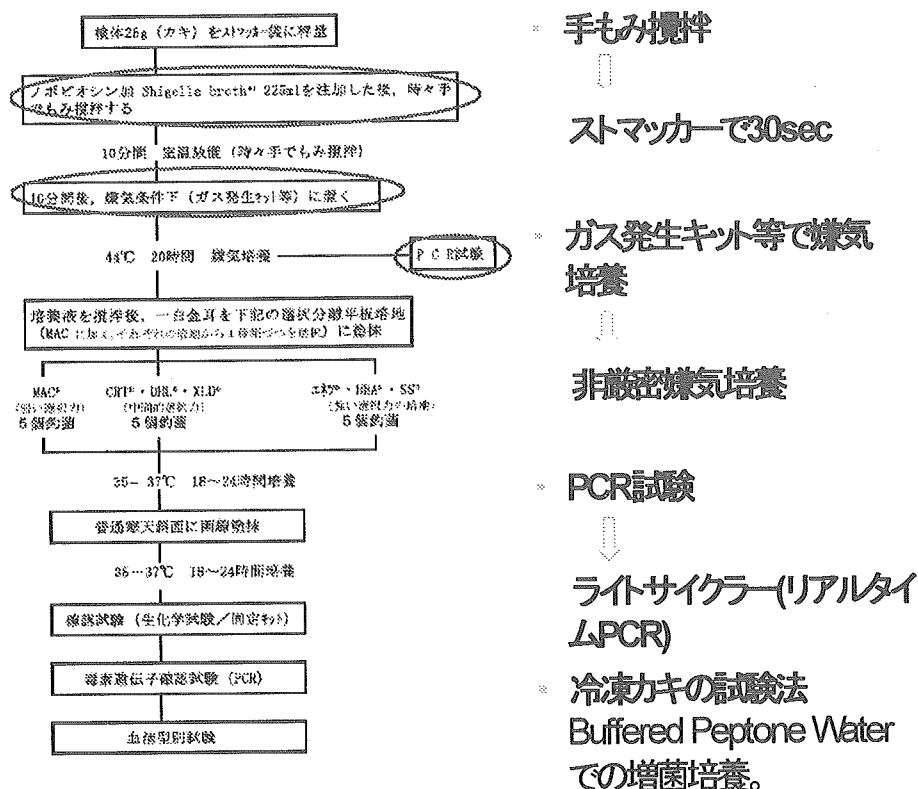
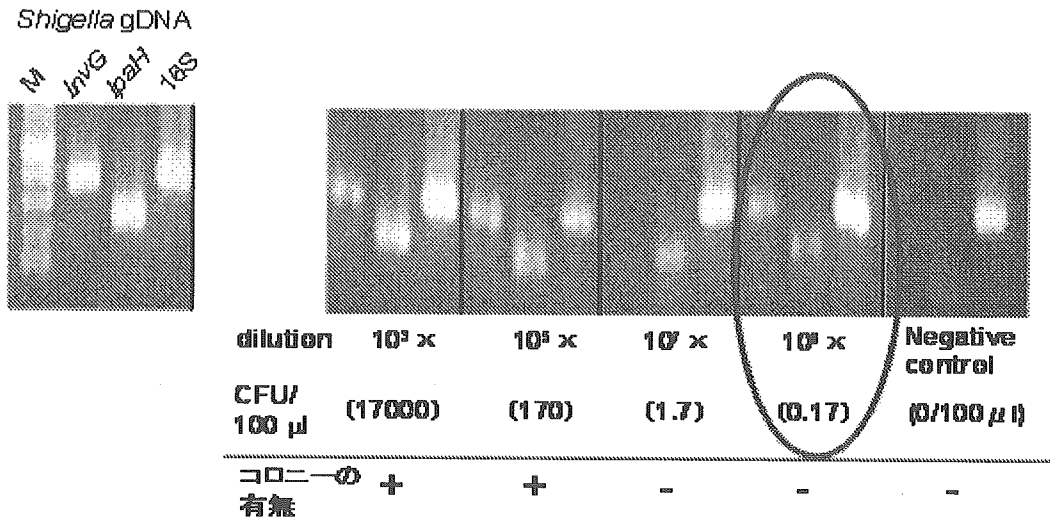


図2, 新規検出法の電気泳動結果

植菌数が1個以下のサンプルに3つ揃ったバンドの出現が見られた。



食品由来の2類感染症のリスクアセスメントモデル構築  
に関する研究（H17-新興-13）

食品からのコレラ菌検査法に関する検討

主任研究者	国立医薬品食品衛生研究所	食品衛生管理部	山本 茂貴
研究協力者	国立医薬品食品衛生研究所	食品衛生管理部	五十君 静言
	国立医薬品食品衛生研究所	食品衛生管理部	朝倉 宏
	国立医薬品食品衛生研究所	食品衛生管理部	石和 玲子
	国立感染症研究所	細菌第1部	荒川 英二
	厚生労働省 大阪検疫所		高橋 直樹

研究要旨

コレラ症は二類感染症の1つに指定されており、感染した場合には急性経過で水溶性下痢、脱水などの重篤な症状を呈することから、危惧すべき感染症である。わが国における発生は海外渡航者のみならず、近年では国内感染例が増加傾向にあり、その原因の一つとしては、食品を介した感染経路が考えられている。従って、食品からの本菌の検出法の精度・感度の向上は食品安全上、非常に重要である。本研究では、魚介類からのコレラ菌検出に関する通知検査法に基づく検査の結果、冷凍輸入食品の一部でコレラ菌擬陽性として報告された例について分離株の諸性状を検討し、擬陽性反応の原因究明を行った。加えて、一次増菌及びPCR条件を中心に検討を行い、効率よい検査手法の構築に向けた基礎的検討として改良すべき点を挙げた。

A. 研究目的

コレラ症は2類感染症として古くから知られており、感染後、短時間の潜伏期を経て、重篤な水様性下痢を引き起こし、脱水症状から死に至らしめる。本感染症は現在でも発展途上国を中心に発生は絶えず、本症の原因菌である *Vibrio cholerae* は、飲料水あるいは海産物などに付着することが知られており、食品を介した感染を制御する上で留意すべき感染病原体である。

わが国におけるコレラ発症事例については、海外渡航者を中心として水系感染あるいは海産物を主体とする食品媒介性の発生が過去に認められているが、近年では海外渡航歴のない患者の割合が増加しており、食品に起因する本症の国内発生状況の把握は、

リスクアセスメントモデルを構築する上で必要となる。

また、食品からのコレラ菌検査には、平成14年10月21日付の通知（食監発第1021005号、別添参照）が用いられており、平成16年7月2日に、各検疫所に対して「フィリピン産生鮮魚介類を中心とした輸入食品に係るコレラ検査」を通知した際も、当該法を用いることとされた（食安輸発第0702001号）。しかしながら、モニタリング検査期間中には、擬陽性反応の出現とそれに対する質問が検疫所から報告され、同法の精度管理を改めて行う必要があると考えられた。以上の点を踏まえ、本研究事業1年目では、検疫所から報告のあった擬陽性反応を示す本通知法の改善点を探るべく、原因究明を行うとともに、必要

十分な感度・精度を満たす PCR 条件について、食品添加回収試験を含めて検討した。

## B. 研究方法

### 1. 菌株および培地:

本研究には、*Vibrio cholerae* O1 Inaba株、*V. cholerae* O139Bengal株を標準株として供した。特に記載のない限り、培養にはトリプトソイブロス(Becton Dickinson)を用いた。

### 2. 食品からの*V. cholerae*検出法に関する検討:

食品からのコレラ菌検出法については、平成14年10月21日付食監発第1021005号「魚介類等の食品からのコレラ菌の検出方法について」の別添に定める試験検査法に従って行った。その概要を以下に記す。

#### 1 増菌培養

(1)一次増菌培養:検体25gを無菌的に取り出し、225 mlのアルカリペプトン水(pH8.6, 1%NaCl)を加え、35~37°Cで18±2時間静置培養したものを一次増菌培養液とした。

(2)二次増菌培養:一次増菌培養液の上層から1 mlを採取し、よく混和後、その0.5 mlを10 mlのアルカリ性ペプトン水(pH 8.6, 0% NaCl)に接種し、35~37°Cで8±2時間静置培養したものを二次増菌培養液とした。

#### 3)PCR法

①DNA抽出:(1)で採取した一次増菌培養液50 µlに、TE buffer(1 mM EDTA加 10 mM Tris-HCl, pH8.0) 450 µlを加え、100°Cで10分間加熱後、氷冷したものをDNA溶液とした。

②PCR反応:別紙の条件1によりPCRを行い、コレラ菌毒素遺伝子を増幅する。

③電気泳動:1.5~3%アガロースゲルを用いて電気泳動を行い、臭化エチジウムによりDNAを染色後、UVトランスイルミネーター上で写真撮影を行い、バンドの有無を確認した。バンドが確認されない場合はコレラ菌陰性とした。

#### 2 確認試験:

PCRの結果、コレラ毒素遺伝子(*ctxA*)が検出された場合、次の確認試験を実施した。

(1)分離培養:二次増菌培養液の1白金耳をTCBS寒天培地に画線分離し、35~37°Cで18±2時間培養した。

(2)一次鑑別試験:定型的な黄色コロニーの発育が認められた場合、できるだけ多くの菌を釣菌し、O1及びO139抗血清を用いたスライド凝集試験を実施した。凝集を認めない場合にはコレラ菌陰性とし、凝集した場合にはそれらをTSA培地に接種し、35~37°Cで18±2時間純培養し、以下の確認試験を行った。

(3)生化学性状試験:純培養した菌を用いて、ブドウ糖発酵試験及び乳糖又は白糖発酵試験、運動性試験、リジン脱炭酸試験、オルニチン脱炭酸試験、アルギニン加水分解試験、インドール反応、マンニット発酵試験、イノシット発酵試験、オキシダーゼ試験、0%耐塩性試験の各生化学性状試験を実施し、当該菌株が*V. cholerae*であることを確認した。

(4)PCR法:供試菌を超純水50µlに浮遊したものを扱い、1の(2)に従ったPCR法によりコレラ菌関連遺伝子(O1特異遺伝子、O139特異遺伝子、コレラ毒素遺伝子)の検出を行った。

#### 3. 16s rDNA 配列の決定:

生化学性状より*V. cholera non-O1/ O139*と同定された3菌株について、16s rDNA 遺伝子配列を決定し、遺伝学的同定を試みた。当該遺伝子領域はPCR法により増幅し(3)、BigDye terminator ver.3.0で標識後、ABI310 sequence detection systemを用いて配列を決定した。各配列はBlast検索を行い、*V. cholerae* および類縁菌との相同性を確認した。プライマー並びに温度条件については、表1に記した。

#### 4. 遺伝学的同定:

16s-23s intergenic spacer regionの検出を同領域特異プライマーセット(表1)を用いたPCR法により行った。

#### 5. 血清型別:

*Vibrio cholerae* 抗O血清を用いて凝集反応試験を行い、O抗原の同定を行った。

#### 6. 食品添加回収試験:

*V. cholerae* 添加回収試験に際しては、冷凍エビ(インドネシア産)25gを供した。PCRについては、通知法に準拠し、以下の点を検討した。

#### (1) 一次増菌培地:

アルカリペプトン水として、現在の基準として設定されている pH9.2, 1% NaCl に加え、pH8.6, 1% NaCl, および pH8.6, 0% NaCl の計 3 種について増殖効率の面から PCR によるスクリーニングを行い、検出感度への影響について検討した。

#### (2) PCR 条件設定に関する検討:

現行法で規定されている PCR スクリーニング検査の方法は、熱変性 92°C, 1 min; アニール 55°C, 1 min; 伸長 72°C, 1 min (35 サイクル)であるが、サイクル数が一般的なものに比べ、多い。そこで、サイクル数を 35, 30, 25, 20 サイクルと変えたときの検出限界について検討し、十分な検出感度を満たすサイクル数の検討を行った。更に反応時間についても、現行の熱変性 1 分、アニール 1 分、伸長 1 分に加えて、各ステップ 30 秒もしくは変性 30 秒、アニール 30 秒、伸長 1 分の 3 種について検討を加えた。

#### (3) 内部標準の設定:

PCR 検査の精度を検証するため、内部標準として、pBR322 プラスミドとこれに特異的なプライマーを反応液に添加し、PCR 反応を行った。プライマー配列については表 1 に記した。

### C. 研究結果

#### 1. 冷凍食品からの *V. cholerae* 検出状況:

モニタリング期間中(平成 16 年 7 月 3 日～9 月 30 日)に、冷凍エビ・イカ・ロブスターを含む冷凍食品計 45 検体を検査対象として、コレラ菌の汚染状況を把握する目的で検査を行った。その結果、PCR スクリーニング検査において、コントロールである O1 および O139 株(308bp)に比べ、異なるサイズのバンド増幅を認める複数の検体が検出された(表 1)。これらの擬陽性反応の原因を明らかにするため、当該検体より対象となる菌株の分離を行い、再度 PCR スクリーニングを行ったところ、62-11291、62-11292、62-1227、

62-1143 の 4 株で擬陽性バンドが検出された(図 1)。

#### 2. 分離菌株の同定

生化学性状試験により、2 株はいずれも *V. cholerae* の性状を有していたが、残りの 2 株については、(62-11291 および 62-11292 株)はそれぞれ *Aeromonas hydrophila* gr.1 及び *Enterobacter amnigenus* 2 と同定された。62-1227 および 62-1143 株については、更に 16s rDNA 配列を明らかにしたが、*Vibrio* 属として同定された 2 菌株の同配列は何れも *V. cholerae* 及び *V. mimicus* と 100% 相同な配列を有しており、本菌の分類には別の遺伝子をターゲットとする必要性が考えられた。

そこで、近年、16s-23s 領域の DNA 配列の相違から PCR 法を用いて分類できると報告のあるプライマーセット(4)を用いて PCR を行いこれらの分類を行った結果、いずれも *V. cholerae* と同定された(図 2)。血清型別の結果、これらナグビブリオ 2 菌株の O 血清型は O79、O51 であることが明らかとなった。

#### 3. 病原遺伝子の保有状況:

これらナグビブリオ分離株の病原因子の保有状況を明らかにするため、PCR 法により病原遺伝子の保有状況を調査したところ、2 株はいずれも *tcp* および *hlyA* 遺伝子を保有していた。また、2 分離株はいずれも血液寒天上で β 溶血を示した。

#### 4. 毒素遺伝子プライマーセットにより増幅を認めた DNA 断片の塩基配列

*V. cholerae* 2 株は何れも陽性対照である O1、O139 株とは異なるサイズの増幅バンドを認めたことから、増幅 DNA の配列を決定した。その結果、増幅 DNA 断片はいずれも *ctxA* とは明らかに異なっており、毒素活性は有していないと考えられた。

#### 5. 検出法についての検討

##### 1) アルカリペプトン水による PCR 検出感度の変化

冷凍エビ 25g に 0, 1, 100CFU の *V. cholerae* O1 を接種後、アルカリペプトン水(pH 9.2, 1% NaCl; pH 8.6, 1% NaCl; pH 8.6, 0% NaCl) 225ml を添加し、培養後、TE バッファーに懸濁した菌液を加熱し、鋳型として



PCR に供した。*V. cholerae* O1 由来 *ctxA* 遺伝子の検出に際しては、pH 9.2, 1 % NaCl および pH 8.6, 1 % NaCl のペプトン水により両者は共に高感度な検出状況を示したが、pH 8.6, 0 % NaCl のペプトン水を用いた場合には、感度の低下が認められた(図 3)。一方で、O139 Bengal 株を用いた際には、pH 9.2, 1 % NaCl のペプトン水が最も感度が高く、pH 8.6, 1 % NaCl のペプトン水では若干感度が低下した(図 4)。

二次確認検査で使用する Multiplex PCR 系においても、菌株による差異が認められた(図 5 および 6)。以上の結果より、アルカリペプトン水の条件は *V. cholerae* の中でも血清型により至適条件が異なると推察された。

## 2) PCR 条件

PCR 反応条件について検討するため、サイクル数を現行の 35 サイクルに加えて、30、25、20 サイクルとした場合の検出感度の変化を観察した。鋳型 DNA については、約  $10^7$  CFU/ml の *V. cholerae* O1 Inaba, O139 Bengal, O1 *ctxA*(-) 菌液各 1 $\mu$ l を用いた。当該菌数での PCR 反応においては 35 サイクルのみならず、30 および 25 サイクルでも同等の増幅が認められた(図 7)。検出限界について評価するため、*V. cholerae* O139 菌液を  $10^0$ - $10^{-4}$  希釈(約  $10^0$ - $10^4$  CFU)し、PCR を行ったところ、35 および 30 サイクルでは同等に  $10^3$  希釈液 ( $2.59 \times 10^1$  CFU) まで検出できたが、25 サイクルでは感度の低下が認められ、検出限界は、 $10^2$  希釈(約  $10^2$  CFU)であった(図 8)。

また、同時に反応時間の検討を行った。*V. cholerae* O139 は条件 1(現行法)では 35 サイクルおよび 30 サイクルでの変動は示さず、 $10^{-3}$  希釈段階まで検出できた。これを条件 2 の短縮プロトコールで実施したところ、同等に検出され、同等の検出感度を担保できることが示された(図 9)。

## D. 考察

本研究では、通知検査法を用いた輸入冷凍食品のコレラ菌検査の段階で、擬陽性反応が出たことに端を発し、その原因を究明するとともに、検出法を改めて検証するこ

とを目的とした。コレラ症の原因食品としてはエビやイカなどが主体と考えられるが、実際に擬陽性対象食品として挙げられたのもこれに属する冷凍食材であった。

*ctx* 遺伝子は染色体に埋め込まれたファージ遺伝子であり、変換ファージは動物体内において他のコレラ菌へと伝達されることで毒素産生性を獲得することが知られている(2)。この現象は、自然界に広く分布する Ctx 陰性のナグビブリオもまた、毒素産生を獲得する可能性があるといえ、ナグビブリオによる食品汚染は、潜在的な感染源ともなりうる。実際に、本研究において分離された 2 株のナグビブリオはいずれもコレラ毒素非産生であったが、*ctx* ファージの受容体である *tcp* 遺伝子を保有していた。Miyagi らは、大阪湾の海水中より検出されたナグビブリオも高い割合で *tcp* 遺伝子を有していることを報告しており(1)、環境分離株の高頻度な *tcp* 遺伝子の保有は、新たな *ctx* 獲得株の出現を招くと懸念される。

また、毒素遺伝子はしばしばコレラ菌の検出法に使用されるが、そのほかの類似菌についても陽性を示すことが複数報告されている。本研究ではわが国における現行検査法について検討を行い、同様に *Aeromonas* や *Enterococcus* 属菌で擬陽性反応を示しうることを明らかにした。また、ナグビブリオ 2 株についても陽性対照に比べて低分子のバンドが検出されており、PCR 条件を再考する必要性が考えられた。

実際に、PCR 反応条件を検討し、サイクル数を低減して、その検出感度および精度を保てる基礎データを得た。すなわち、30 サイクル反応系では 35 サイクルの場合と同等に対象遺伝子群の検出を行い得た。更に、反応時間の短縮によっても、本検出系は感度は同等に保たれており、*ctxA* 擬陽性反応も 30 サイクルに PCR サイクル数を低減することにより、消失した。現行反応系では、約 105 分の時間を要するが、短縮プロトコールについては約 60 分で終了する。食品検査については多検体であることに加え、食品という特性上、迅速な検査が求められる。したがって、

本法の適用は、同等の感度を担保しつつ、より迅速な検査を行う上で有用と考えられる。

食品からの当該菌検出を行うに当たっては、しばしば食品マテリアルによる干渉を受け、検出が困難となることも多い。その原因の一つとしては、生きているが培養できない、いわゆる VBNC (Viable But Non-Culturable) 状態に移行することが近年指摘されており、潜在的な感染病原体として、食品を介した感染に関与している可能性も考えられる。今後は、この VBNC 状態を実験的に作出し、生体への病原性評価ならびに遺伝学的手法による生理活性の検出を測定することで、食品の安全性を図る上での VBNC 菌の重要性を明らかにする必要があると思われる。

#### E. 結論

本研究では、以下の結論を得た。

- 1) 輸入冷凍エビ・イカから PCR スクリーニング検査で *ctxA* 擬陽性と思われる反応が認められ、ナグビブリオ 2 株、*Aeromonas* および *Enterococcus* 属菌各 1 株が当該検出菌として分離された。
- 2) 擬陽性反応が出たことを受け、PCR 条件について検証した結果、当該増幅バンドは毒素遺伝子ではなく、サイクル数および反応時間の短縮により消失することを明らかにした。
- 3) スクリーニング検査の感度・精度について検証を行い、①一次培養に用いるアルカリペプトン水について、*V. cholerae* O1 の検出感度は pH 9.2, 1% NaCl および pH 8.6, 1% NaCl で同等であった。② *V. cholerae* O139 の検出に際しては、pH 9.2, 1% NaCl の条件が至適であった。③ PCR サイクル数については、30 サイクルで 35 サイクルと同等の感度が保たれた。④ 反応時間については、熱変性ならびにアニーリング時間を半減しても感度は同等であったことから、短縮プロトコールとして有用と考えられた。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

投稿準備中

#### H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

##### 1. 特許取得

なし

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

なし

#### I. 引用文献

1. Miyagi K, Nakano T, Yagi T, Hanafusa M, Imura S, Honda T, Nakano Y, Sano K. Survey of *Vibrio cholerae* O1 and its survival over the winter in marine water of Port of Osaka. *Epidemiol Infect.* 2003. 131(1): 613-9.
2. Waldor MK, Mekalanos JJ. Lysogenic conversion by a filamentous phage encoding cholera toxin. *Science.* 1996. 272(5270): 1910-4.
3. Warsen AE, Krug MJ, LaFrentz S, Stanek DR, Loge FJ, Call DR. Simultaneous discrimination between 15 fish pathogens by using 16S ribosomal DNA PCR and DNA microarrays. *Appl Environ Microbiol.* 2004. 70(7): 4216-21.
4. Chun J, Rivera NG, Colwell RR. Analysis of 16s-23s rRNA intergenic spacer of *Vibrio cholerae* and *Vibrio mimicus* for detection of these species. *Methods. Mol. Biol.* 179: 171-178.

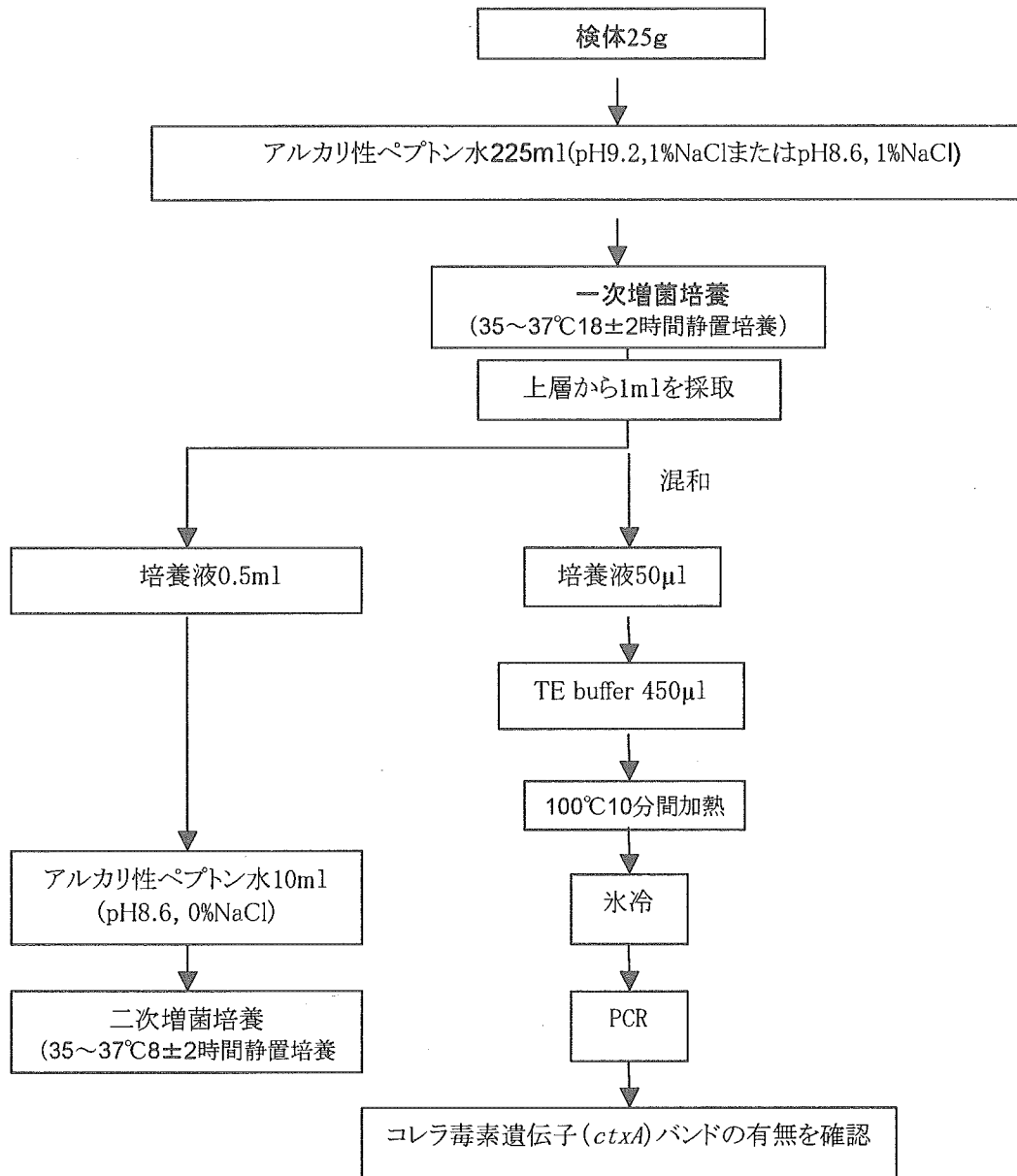


図1 魚介類等の食品からのコレラ菌検出法(一次スクリーニング)

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 M

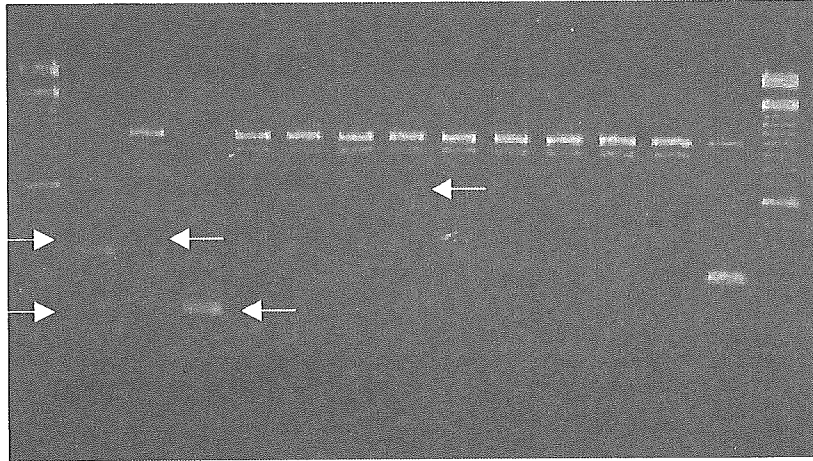


図1 冷凍食品から検出された PCR スクリーニング擬陽性反応  
擬陽性バンドについて、矢印で示した。

Lanes; M, 1-kb ladder; 1, 62-11291; 2, 62-11292; 3, 62-1227; 7, 62-1143;  
4-6, 8-12; *ctxA*-陰性株; 13, *V. cholerae* O1.

M 1 2 3 4 5 6 7

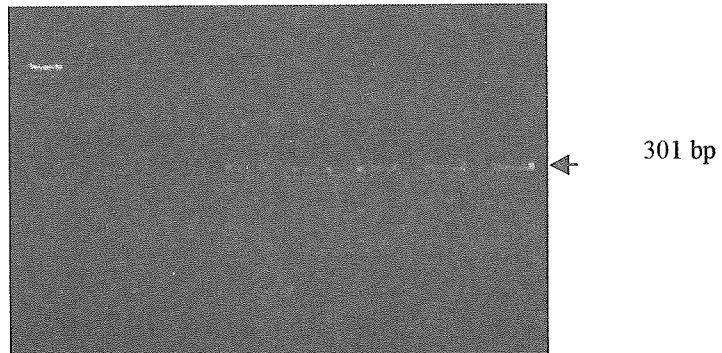


図2 16s-23s intergenic spacer region の検出による *V. cholerae* の同定

Lanes, M, marker ( $\lambda$ /HindIII); 1, 62-11291; 2, 62-11292; 3, 62-1227; 4, 62-1143; 5, *V. cholerae* O39; 6, *V. cholerae* O1; 7, *V. cholerae* O139