

## A. 研究目的

ヒトに下痢症などの消化器症状の原因となる下痢原性大腸菌は、腸管出血性大腸菌 (EHEC)、腸管毒素原性大腸菌 (ETEC)、腸管侵入性大腸菌 (EIEC)、腸管病原性大腸菌 (EPEC)、腸管凝集付着性大腸菌 (EAggEC) 等に分類されているが、平成 24 年より国立感染症研究所感染症情報センター(現、感染症疫学センター)病原体検出情報システムの下痢原性大腸菌の分類及び定義の改定により、EPEC の指標は、特定の O 血清群によるものから *eae* 等を対象とした遺伝子検査へ変更になった。

しかし、*eae* 遺伝子を有する EPEC は健康者からも分離されることが有り、また分離された EPEC についても病原性等について不明瞭な部分が多い事を鑑み、*eae* 遺伝子を指標として分離される EPEC について、新たな知見を得るべく、本研究を実施することとなった。

本研究の主たる目的は、*eae* 遺伝子を有する EPEC の全国的保菌者数の推測及び、分離される EPEC の病原性について検討することとした。

## B. 研究方法

### B-1. EPEC 保菌者数の推測

川崎市をモデルとした EPEC の分離率(%)を確認し、得られた分離率から全国的保菌者数を推測することとした。

#### 1. 供試検体

本市健康安全研究所に搬入される EPEC 以外の病原微生物が原因と推測された食中毒、感染症患者及びその接触者等の検便検体のうち、DHL 寒天培地への直接塗抹により大腸菌様コロニーの分離が可能であった 722 検体を供試検体とした。

#### 2. 検査方法

EPEC の分離については、培地から釣菌した大腸菌様コロニーを 3 コロニーと、濃厚発育部分について、PCR 法を用い *eae* 遺伝子のスクリーニングを実施した。サンプル

の調製は滅菌蒸留水 100 $\mu$ l に菌体を懸濁後 100 $^{\circ}$ C、5 分加熱し、14,000rpm、5 分遠心し、その上清を使用した。プライマーは *eae*k1 (5'-GCTTAGTGCTGGTTTAGGAT-3') 及び EA2 (5'-CTCTGCAGATTAACCTCTGC-3') を使用した。

スクリーニングにて *eae* 遺伝子陽性であった大腸菌を対象に、VT、STp、STh、LT、*invE*、*ipaH*、*aggR* の各遺伝子の検出を PCR 法にて行い、いずれの遺伝子も陰性であることが確認された株を EPEC とし、分離された EPEC の株数と供試検体数から求められる分離率をもとに全国的保菌者数を推測した。

### B-2. EPEC の病原性の検討

#### 1. *bfp* 遺伝子の有無

分離された EPEC 全株を供試株として、マイクロコロニー形成に関する集束線毛遺伝子 (bundle forming pili 遺伝子, *bfp*) の有無を PCR 法にて確認し、当該株が typical-EPEC (t-EPEC) 又は atypical-EPEC (a-EPEC) であるかの鑑別を行った。また、病原大腸菌免疫血清 (デンカ生研) を使用し、スライド凝集法にて O 群血清型別を実施した。

#### 2. HEp-2 細胞による付着性試験

EPEC 全株について HEp-2 細胞による付着性試験を実施した。HEp-2 細胞を 10% FBS 加 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) で 37 $^{\circ}$ C 48 時間、5%CO<sub>2</sub> 存在下で培養し、FBS-free DMEM で 1 回洗浄、1% D-mannose 加 DMEM 及び供試菌を 10<sup>7</sup>/ml 程度になるよう接種、1000g で 1 分遠心後、37 $^{\circ}$ C 1 時間、5%CO<sub>2</sub> 存在下で培養した。phosphate-buffered-saline (PBS) で 3 回洗浄し、再度 1% D-mannose 加 DMEM を加え、さらに 37 $^{\circ}$ C 3 時間、5%CO<sub>2</sub> 存在下で培養した。PBS にて 6 回洗浄後、メタノール固定し、ギムザ染色を行い鏡検により、各供試菌株について細胞への付着の有無や、細胞付着形態について確認することで病原性の検討を行った。細胞付着性試験により推測される 3 通りの結果を表 1 に示す。

表 1. 細胞付着性試験により推測される結果と考察

結果	考察
1 全ての株で付着が認められる	EPEC も病原性を有しているが、EHEC 同様宿主の状態や摂取菌量等に依存している可能性が示唆される。
2 EPEC の株により付着性に相違がある	EPEC の病原性は株により相違があると解し、病原性を有する割合を確認することで、全国的数値に換算。
3 EPEC の全株が陰性	EPEC はほぼ無害である可能性が高いことが示唆される。

(倫理面の配慮について)

研究対象者においては、「検査検体の調査研究事業への利用に関する御協力のお願ひ」として同意書の配布を実施。所内においても、検体を取り扱う際には研究対象者名とは別に付番された検体番号として取り扱うなど、個人情報に関する一般的な取扱いについては十分注意した。

## C. 研究結果

### C-1. EPEC 保菌者数の推測

平成 25 年 4 月から平成 25 年 11 月までに搬入された 722 検体を供試検体とし、分離率の確認を行った結果、25 株の *eae* 遺伝子陽性株を分離した。しかし *eae* 遺伝子陽性株のうち 3 株で VT 遺伝子が陽性であったため、EPEC と同定した株は 22 株となった。

供試検体数及び EPEC 分離株数より、川崎市での EPEC の保菌率は 3.05% であった。よって、厚生労働省の人口動態調査（平成 25 年 1 月）の報告より、日本の人口を 125,961,000 人とすると、日本においては 3,841,811 人の EPEC 保菌者が居るものと推測された。

分離された 22 株のうち、20 株は保健所からの患者情報より、健康者と推測され、EPEC 以外の食中毒原因微生物の検出が認められない検体より分離された株であった。残り 2 株は有症者より分離された株であり、いずれの検体も EPEC 以外に、ノロウイルスが分離されていた。

### C-2. EPEC の病原性の検討

今回分離された EPEC 全株の *bfp* 遺伝子検査の結果は全て陰性であり、22 株全てが a-EPEC であった

また O 群血清型別結果においては、O 群

血清型別可能であった株は 7 株（O15、O55、O63、O124 が 2 株、O125、O145）であり、残り 15 株は OUT であった。

HEp-2 細胞による細胞付着試験の結果は局在性付着 (LA) を示す株が 1 株、散在性付着 (DA) を示す株が 1 株確認であった。また、付着を示した 2 株はいずれも OUT の株であった。(表 2)

表 2 分離された EPEC 菌株

O血清型	症状	株数	<i>eae</i>	<i>bfp</i>	細胞付着性試験
O15	(無) <sup>※1</sup>	1	+	-	NA <sup>※2</sup>
O55	有	1	+	-	NA
O63	(無)	1	+	-	NA
O124	(無)	2	+	-	NA
O125	(無)	1	+	-	NA
O145	(無)	1	+	-	NA
OUT	(無)	1	+	-	LA
OUT	(無)	1	+	-	DA
OUT	(無)	11	+	-	NA
OUT	無	1	+	-	NA
OUT	有	1	+	-	NA
total		22			

※ 1: 無)…症状の有無が無記載であるが健康者と推測

※ 2: NA…non-adherent

## D. 考察

### D-1. EPEC 保菌者数の推測

今回の調査では、本市における EPEC の保菌率は 3.05% であった。諸外国の調査において乳幼児における保菌率は成人の集団より高率であると報告されている。

我が国における報告はとして、1994 年に佐賀県で健康乳幼児を対象として実施された調査報告における保菌率は 6.12% であった。

しかし、2011 年に宮城県における EHEC 患者の接触者 172 人を対象として実施された EPEC の保菌率についての調査報告における保菌率は 2.33% であり、今回の本市における EPEC 保菌率 (3.05%) の結果により近いものであった。

今後、対象検体の年齢調査を加味し、本市における年齢分布を含めたより詳細な EPEC の保菌率を検討したいと考えている。

### D-2. EPEC の病原性の検討

*bfp* 遺伝子は、感染部位である腸管上皮細胞上でのマイクロコロニー形成に関与し、EPEC が宿主の細胞に付着する際に重要な

遺伝子であるため、*bfp* 遺伝子を保有している *t*-EPEC の方が *a*-EPEC に比べ病原性が高いことが報告されている。今回のスクリーニングにおいては *bfp* 遺伝子を保有する株 (*t*-EPEC) は分離されず、すべての分離株が *a*-EPEC であり、その病原性は低いものと考えられた。*t*-EPEC の保菌率を確認するためにはより多くの検体を対象としたスクリーニングの実施を検討する必要があるものと思われた。

O 群血清型別においては、分離された EPEC 22 株で血清型別可能であった 7 株のうち、O 群血清型による EPEC の分類に属していたものは、O55 及び O125 の 2 株 (9.09%) のみであった。さらに、O 群血清型別可能であった 7 株は、いずれも HEp-2 細胞への付着は認められず、本研究結果においては、市販の大腸菌免疫血清により血清型別が可能である EPEC と細胞付着性に関連性はみられなかった。

細胞付着性試験においては、LA、DA を示す株がそれぞれ 1 株 (4.55%) ずつ認められた。1998 年～2000 年に東京都多摩地区で 525 名の散発下痢症患者由来の大腸菌を対象とし実施された *eae* 遺伝子のスクリーニングの調査報告においては、分離された EPEC 18 株における細胞付着性試験において 13 株 (72.2%) が LA、2 株 (11.1%) が DA を示したことが報告され、散発下痢症患者由来の EPEC 株においては、本研究より高い割合で細胞への付着が認められたことから、細胞付着性と病原性には相関性があることが示唆された。

また、DA を示す大腸菌の病原性については、多くの議論があるものの、1986 年の Gomes らの実施した、DA を示す大腸菌のボランティアへの経口投与実験の報告においても、被験者はほとんど、または全く下痢を起さなかったとの報告があることや、DA を示す大腸菌は下痢症患者より健康者のほうが高い検出率を示す報告もあることなどから、本研究においては DA を示す大腸菌についてはヒトに対し下痢症の原因となる可能性が極めて低いものと解釈し、LA を示す大腸菌のみ病原性を有しているものと定義することとした。今回の調査におい

て分離した EPEC 株のうち LA を示す株が 1 株存在したことから、表 1 に示した「細胞付着性試験により推測される結果と考察」の結果 2 に該当することとなった。

よって、病原性を有している EPEC の保菌率は全検体 (722 検体) のうち 0.14% であり、日本の人口を 125,961,000 人から換算すると病原性を有する EPEC は 176,345 人が保菌し、714 人に 1 人の割合で保菌していることが推測された。

## E. 結論

本研究により示した川崎市における *eae* 遺伝子保有 EPEC の保菌率は表 3 に示すとおり、3.05% であり、その保菌率より全国的保菌者数は 384,1811 人と推測された。しかしながら、本研究において LA を示し、病原性を有することが示唆された EPEC の割合は低く (4.55%) その分離率 (0.14%) から推測される保菌者数は 176,345 人であり、健康者または有症者であっても他の病原微生物が分離されている検体から分離された EPEC については、病原性を有する割合は非常に低いと考えられた。

このことから、EPEC の病原性については、*eae* 遺伝子の有無のみで判断することは難しく、検査対象者の症状や他の病原因子の有無を加味した上で検討することが重要であるものと思われた (表 3)

表 3. EPEC 保菌者推測値 (人)

	対象数	EPEC 保菌者数 (%)	病原性を有する EPEC 保菌者 (%)
川崎市スクリーニング	722	22 (3.05)	1 (0.14)
日本人口換算推測値	125961000	3841811 (3.05)	176345 (0.14)

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

なし

### 2. 学会発表

清水亜希子、小嶋由香、湯澤栄子、佐藤弘康、岩瀬耕一、岡部信彦

川崎市で分離された EHEC 及び EPEC の RFLP 法による *intimin* の遺伝子型別  
 神奈川県公衆衛生学会 2013 年 11 月 1 日

G. 知的所有権の出願・登録状況

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし

平成 25 年度 厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）

「食中毒調査の精度向上のための手法等に関する調査研究」

分担研究報告書

地域における原因食品推定法の検討

研究分担者	小澤 邦壽	群馬県衛生環境研究所
研究協力者	森田 幸雄	東京家政大学
	木村 博一	国立感染症研究所
	石岡 大成	国立感染症研究所
	小畑 敏	群馬県食肉衛生検査所
	藤田 雅弘	群馬県食肉衛生検査所
	柰代 俊枝	群馬県食肉衛生検査所
	櫻井 敏子	群馬県食肉衛生検査所
	杉田 裕子	群馬県食肉衛生検査所
	菊池茉莉花	群馬県食肉衛生検査所
	静野 直穂	高崎市食肉衛生検査所
	久保 雅敏	高崎市食肉衛生検査所
	森 典子	高崎市食肉衛生検査所
	須藤 真登	高崎市食肉衛生検査所
	井上 伸子	群馬県衛生環境研究所
	河合 優子	群馬県衛生環境研究所
	塚越 博之	群馬県衛生環境研究所
	丹羽 祥一	群馬県衛生環境研究所
	佐々木佳子	群馬県衛生環境研究所
	吉住 正和	群馬県衛生環境研究所
	横田 陽子	群馬県衛生環境研究所
	下田 雅昭	群馬県衛生環境研究所
	黒澤 肇	群馬県衛生環境研究所

#### 研究要旨

食中毒調査の精度向上のための手法等に関する調査研究として、細菌汚染が最も危惧される食肉に注目し、食肉処理場等で処理される食肉から分離される食中毒原因物質の汚染状況を調査し、地域における原因食品推定法の検討を行った。食中毒事件の汚染原因に関与する食肉における課題を二項目設定し、それぞれ実施した。第一は食鳥処理場に搬入された鶏から分離される大腸菌における血清型別および薬剤耐性に関するβラクタマーゼ産生の調査、第二は食肉処理場に搬入された牛の肝臓等から分離される腸

管出血性大腸菌（EHEC）とカンピロバクター属菌の検索とその臓器内の分布である。

本県および近県から食鳥処理場へ搬入された鶏では、大腸菌症等を呈する鶏肝臓の炎症部位から大腸菌が合計 159 株分離された。分離株の血清型別は、O25 が 41 株（25.8%）と全体の約四分の一を占め、次いで O78 が 31 株（19.5%）などであった。市販血清で型別不能となった分離株は 64 株（40.3%）あった。また、高頻度に分離される O25 や O78 の血清型は、各地域の農場で確認されたが、分離率の低い血清型は、各農場や地域間で明瞭な違いは見られなかった。薬剤感受性（耐性）試験では、10 剤耐性が 10 株（6.3%）、9 剤耐性が 19 株（11.9%）、8 剤耐性が 5 株（3.1%）、7 剤耐性が 22 株（13.8%）などで、農場や地域間差は少ないが、その大部分は多剤耐性株であった。基質特異性拡張型 β-ラクタマーゼ（ESBL）産生は、159 株中 32 株（20.1%）にみられ、また、同遺伝子（CTX-M 型）の保有も確認された。ESBL 産生株は、地域別および同じ県内の農場別においても分離差が認められた。

食肉処理場で解体処理されたと体（牛 11 頭）から採材した肝臓等の計 220 検体では、O-157（ベロ毒素遺伝子）Screening PCR において、盲腸便 2 検体からの分離株が陽性を示した。1 検体は病原大腸菌（血清型）O6 であったが、O-157&ベロ毒素遺伝子同時検出キットでベロ毒素（VT）遺伝子の保有はなかった。他 1 検体は、血清型別不能で、同検出キットで VT 毒素遺伝子の保有はなかった。今年度の検索では、昨年同様 EHEC は検出されなかった。カンピロバクター属菌の検索では、肝臓実質からは 11 と体中 5 と体（45%）、胆汁からは 11 と体中 5 と体（45%）、盲腸便からは 11 と体中 9 と体（82%）で分離された。肝臓の葉別では、肝管・総胆管に近接する方形葉および左葉からも本菌が検出されており、感染牛での汚染範囲は、ほぼ肝臓全体に及ぶことが推定された。さらに本菌は出荷別（農場別）に全て不検出のところもあり、また、個別別に共通の血清型が分離される検体もあることが確認された。

今年度の本研究での検討から、食鳥処理場で処理された鶏から分離される多剤耐性大腸菌および ESBL 産生大腸菌の検索、また、牛の肝臓、胆汁、盲腸便など異なる採材部位から分離されるカンピロバクター属菌の汚染調査は、継続して実施することにより、食中毒事件発生時の疫学調査において、発生地域における食材等の原因食品の推定に寄与できることが示唆された。

## A. 研究目的

### A-1. 食鶏由来大腸菌の薬剤耐性遺伝子の検索および地域における検出状況

前年までの研究では、近県の農場より食鳥処理場に搬入された鶏から大腸菌が高頻度で分離されることが分かった。そして、病原大腸菌の O 群による血清型別

では、農場別など地域特性のあることが確認された。現在、院内感染症の原因となるグラム陰性桿菌の多くは、接触感染等によって患者間を伝播するとされるが、近年はこの原因菌の多剤耐性化が進み、家畜等動物の保菌からの二次感染も問題視されている。こうした現状から、今年

度は、食鶏から高率に分離される大腸菌について、ESBL 産生等の多剤耐性に関与する薬剤耐性遺伝子の保有を検索し、地域における検出状況を確認する。そして、食中毒調査における原因食品推定に寄与する可能性について検討する。

#### A-2. 牛肝臓から分離される食中毒原因菌および肝臓内部における分布状況

牛生肉および牛生レバーの喫食が関係する EHEC 等の食中毒事件の発生状況から、食品、添加物の規格基準の一部を改正する件、昭和 34 年厚生省告示 370 号の一部改正（平成 23 年厚生労働省告示第 321 号）により適用されてきた生食用食肉の規格基準がより厳格に規定され、平成 23 年 10 月 1 日に施行された。また、昭和 34 年厚生省告示 370 号の一部改正（平成 24 年厚生労働省告示第 404 号）により、平成 24 年 7 月 1 日から牛肝臓の生食での安全性を確保する知見が得られるまでの間、牛肝臓を生食用として販売することが禁止された。しかし、平成 25 年 8 月には違法に提供された生レバーで、カンピロバクター属菌を原因とする広域食中毒事件が発生しており、依然として牛肝臓の生食提供による健康被害が問題となっている。そこで今年度は昨年につき、牛肝臓等における食中毒原因物質（EHEC およびカンピロバクター属菌）の検索を行い、保菌状況および肝臓内部の分布状況を把握して、食中毒調査における EHEC およびカンピロバクター属菌の原因食品推定に寄与する可能性について検討する。

## B. 研究方法

### B-1. 食鶏由来大腸菌の薬剤耐性遺伝子の検索および地域における検出状況

平成 24 年 5 月～6 月に食鳥処理場に搬入された鶏を対象として、疾病検査時に大腸菌症および類似症状を伴ったと体から肝臓を採取し検体とした。サンプルの肝臓表面を火炎滅菌後に割面を入れ、DHL 寒天培地に直接スタンプをして塗抹を行った。培養は 37℃で 24 時間実施し、大腸菌が疑われるコロニーを釣菌して TSI や LIM 寒天培地などで確認し、生化学的性状試験の結果から大腸菌を同定した。大腸菌と同定された菌株について、市販血清（病原大腸菌免疫血清：デンカ生研）を用いて血清型別（O 群）試験を実施した。

薬剤感受性（耐性）菌の検索については、薬剤ディスク（センシディスク：BD）12 剤（LCM, OTC, CET, AMPC, ABPC, LVFX, NFLX, NA, ST, KM, FOM, CL）を用いてスクリーニングを行った。判定は米国臨床検査標準化協会（CLSI）が示しているブレイクポイントに基づいて実施した。また、ESBL 産生菌の検出は、薬剤耐性菌検査用ディスク（ESBLs-CAZ/CVA、ESBLs-CTX/CVA、ESBLs-CPX/CVA：栄研化学）を用いて、β-ラクタマーゼ阻害を確認した。さらに薬剤感受性試験紙（シカベータテスト：関東化学）を用いて ESBL、メタロ-β-ラクタマーゼ（MBL）、AmpC 型 β-ラクタマーゼの検索を行った。MBL については、上記試験紙による検索の他に薬剤耐性菌検査用ディスク（メタロ-β-ラクタマーゼ SMA：栄研化学）、イミペネムおよびメロ

ペネム（センシディスク：BD）を用いて判定した。PCR法によるESBL産生遺伝子（TEM型、SHV型、CTX-M型）の検出は、柴田らの方法に準じ、以下の反応系で実施した。反応条件は初期変成94℃ 2分、熱変性94℃ 1分、アニーリング55℃ 1分、伸長72℃ 1分30秒を30サイクルとした。各種プライマーは、TEM型（PCR産物のサイズ824bp）、F:5'-CCGTGTCGCCCTTATCGC-3'、R:5'-AGGCACCTATCTCAGCGA-3'、SHV型（PCR産物のサイズ1,051bp）、F:5'-A TTTGTCGCTTCTTTACTCGC-3'、R:5'-T TTATGGCGTTACCTTTGACC-3'、CTX-M-1グループ（PCR産物のサイズ516bp）、F:5'-GCTGTTGTTAGGAAGTGTGC-3'、R:5'-CCATTGCCCGAGGTGAAG-3'、CTX-M-2グループ（PCR産物のサイズ780bp）、F:5'-ACGCTACCCCTGCTATTT-3'、R:5'-CCTTTCCGCCTTCTGCTC-3'、CTX-M-9グループ（PCR産物のサイズ393bp）、F:5'-GCAGATAATACGCAGGTG-3'、R:5'-CGGCGTGGTGGTGTCTCT-3'を使用した。

## B-2. 牛肝臓から分離される食中毒原因菌および肝臓内部における分布状況

平成25年8月～11月の期間に食肉処理場へと畜解体のため普通搬入された牛11頭を対象として、牛肝臓および同一個体の胆汁、盲腸便を採取し検体とした。盲腸便および肝臓を内臓検査場所から採取、別室にて滅菌済み注射針および注射筒で胆汁を約10ml採取し、次に胆嚢を取

り除き、肝臓実質は部位により18ブロックに分割した（図1）。牛11と体から採取した検体数は、肝臓実質が198（11×18）検体、胆汁が11検体、盲腸便が11検体の計220検体であった。EHEC検索の目的で、PCR法によるVT遺伝子の検出は以下の方法で実施した。肝臓実質はコンタミネーションを防止するためブロック周囲をアルコール消毒および火炎滅菌してから無菌的に中心部を10g採取した。mECブロス90mlを加え、約1分間ストマッキングした後、42℃で18～20時間培養した。胆汁、盲腸便は各1ml（≒1g）にmECブロス9mlを加え攪拌した後、同様に42℃で18～20時間培養した。肝臓実質を培養したmECブロスは、遺伝子抽出キット（Qiamp DNA Mini Kit：QIAGEN）を用いて処理した後、胆汁・盲腸便を培養したmECブロスは、アルカリ熱抽出法で処理した後、それぞれO-157（ベロ毒素遺伝子）Screening PCR（タカラバイオ）およびO-157&ベロ毒素遺伝子同時検出キット（タカラバイオ）でPCR検査を実施した。O-157（ベロ毒素遺伝子）Screening PCRでの陽性検体については、培養液（mECブロス）をO157、O26およびO111に特異的な免疫磁気ビーズ（デンカ生研）を用いて処理し、CT-SMac、CT-RMacおよびCT-SBMacに画線塗抹した。また、培養液（mECブロス）を直接DHL寒天培地およびクロモアガーEHECにも画線塗抹した。37℃で24時間培養後、それぞれの平板上に発育したEHECを疑うコロニーを純培養し、TSI寒天培地、LIM寒天培地等で生化学的性状を確認した。



カンピロバクター属菌の検索では、EHECと同様に採取した検体について、肝臓実質および盲腸便は1g、胆汁は1ml(≒1g)を9mlのプレストン培地に入れ、42℃で22～24時間微好気培養した。培養液をCCDA培地に画線塗抹し、42℃で48時間微好気培養した。そして、カンピロバクター属菌を疑うコロニーを1～5個釣菌し、純培養した後、生化学的性状試験およびPCR法にて属種を判定した。さらに分離されたカンピロバクター属菌について、1と体内で複数箇所から採取された分離株、同一出荷者かつ同種の血清型であった分離株について、菌株間の相同性を確認するために制限酵素*Sma*I、*Kpn*Iで処理した後、PFGE(pulsed-field gel electrophoresis)法による遺伝子多型解析を実施した。

(倫理面への配慮)

本研究では個人が特定されること、また、不利益を被る情報は用いていない。

## C. 研究結果

### C-1. 食鶏由来大腸菌の薬剤耐性遺伝子の検索および地域における検出状況

前年までの研究結果では、肉眼所見から大腸菌症と判定された107羽(7県27農場)のうち37羽(6県18農場)の疾病症状を呈する鶏肝臓の炎症部位から、大腸菌が159株分離された。今回検討した大腸菌の血清型別試験では、O25が41(41/159)株、O78が31(31/159)株、O153が7(7/159)株、O8が4(4/159)株、O142が3(3/159)株、O1およびO6が各2株、他はO15、O55、O103、O114、

O124が各1株であった。また、市販血清で型別不能(OUT)である株が64(64/159)株(40.3%)認められた。高頻度に分離された血清型O25とO78は、各地域の農場から共通して検出されていることが分かったが、検出率の低い血清型では各農場や地域間で明瞭な違いはなかった。

薬剤感受性(耐性)試験では、使用した12薬剤に対して、大腸菌159株は、10剤耐性が10株、9剤耐性が19株、8剤耐性が5株、7剤耐性が20株、6剤耐性が22株、5剤耐性が35株、4剤耐性が4株、3剤耐性が5株、2剤耐性が21株、単剤耐性が18株であった。薬剤別耐性株数は、セファロチン121株(76.1%)、アンピシリン114株(71.7%)、アモキシシリン112株(70.4%)などであった。大腸菌の薬剤耐性パターンでは、農場や地域による明瞭な分布の違いはなかったが、その大部分が多剤耐性株であることが認められた。ESBL産生株の検出では、薬剤感受性試験のシカベータテストは31(31/159)株(19.5%)が陽性を示したが、CLSIによるディスク拡散法では、32(32/159)株(20.1%)が陽性と判定された。PCR法ではCTX-M1グループ16株(16/159)、CTX-M2グループ16株(16/159)からESBL産生遺伝子が検出されたので、計32株(20.1%)を同産生株と判定した。そして、MBL産生遺伝子およびAmpC産生遺伝子の検出はなかった。今回分離されたESBL産生大腸菌は地域によっても分離率に差が見られ、同じ県内においても農場別に大きな差が認められた(表1)。

### C-2. 牛肝臓から分離される食中毒原因

菌および肝臓内部における分布状況

EHEC の検索では、牛 11 頭のと体から採取した肝臓実質 198 (11×18) 検体、胆汁 11 検体、盲腸便 11 検体の計 220 検体は、ベロ毒素 Screening PCR において、盲腸便 2 検体からの分離株は陽性を示したが、他は全て陰性であった。この盲腸便 2 検体の分離株について、EHEC 検索のため生化学的性状等培養による同定を試みた。1 検体は病原大腸菌 O6 と血清型別されたが、O-157&ベロ毒素遺伝子同時検出キットで VT 遺伝子の保有はなかった。他 1 検体は、病原大腸菌免疫血清では型別不能で、同検出キットで VT 遺伝子の保有は確認できなかった。今回の検索では EHEC は 11 と体の採材から、昨年同様 1 検体も検出されなかった。

カンピロバクター属菌の検索では、肝臓実質からは 11 と体中 5 と体 (45%)、胆汁からは 11 と体中 5 と体 (45%)、盲腸便からは 11 と体中 9 と体 (82%) から本菌が検出された (表 2)。また、4 と体においては、肝臓実質の複数ブロックから同属菌が分離された。肝臓実質から分離された部位は、左葉・方形葉・尾状葉であった。カンピロバクター属菌の型別では、*Campylobacter (C.) coli* は 3 と体の盲腸便、1 と体の胆汁、1 と体の 1 ブロックから検出された。また、*C. jejuni* は盲腸便では 1 と体、胆汁では 4 と体、肝臓実質では 4 と体の 18 ブロックから検出された。そして、1 と体の盲腸便は血清型別不能 (推定: *C. jejuni*) であった。今回は 1 と体については、*C. coli* と *C. jejuni* が同時に検出されなかった。さらに同一と体から採取された菌株の PFGE

による遺伝子多型解析では、DNA 切断パターンが全て一致したと体と数グループ (パターン) に分けられると体とがあった。また、同一出荷 (農場) での比較では、DNA 切断パターンが一致した株はなかった。

#### D. 考察

##### D-1. 食鶏由来大腸菌の薬剤耐性遺伝子の検索および地域における検出状況

近年は薬剤耐性菌の増加が大きな社会問題になっており、院内感染等の臨床現場での各種抗菌剤の使用のみならず、畜産や養鶏場などでの多目的な使用も無視できない。こうした薬剤耐性菌の出現に対しては、食肉の不適切な取扱いや調理法等により、ヒトが喫食し感染することが指摘されている。特に食肉 (鶏、豚、牛) の中で、鶏肉から多剤耐性大腸菌が高頻度に分離されることが報告されている。食鶏の主要細菌性疾患である大腸菌症は、食鳥処理場 (臨場検査) で多数見受けられる所見ではあるが、処理工程で完全に菌を排除することは極めて困難な状況にある。昨年度からの調査で、大腸菌が高率に分離されていることは、食用の鶏肉が大腸菌汚染を受け、不完全な加熱調理によりヒトが感染する可能性の高いことが示唆される。感染により消化器症状を伴えば、医療機関での治療もあり得るが、無症状保菌の状態であれば、他のヒトへの二次感染あるいは食中毒原因の媒介となる可能性も否定できない。また、今回も鶏肝臓の炎症部位から高頻度に多剤耐性大腸菌、ESBL 産生大腸菌が分離されていることから、食中毒原因菌

調査で、鶏肉の喫食状況があれば、これらを主軸に検索することによって原因食品の推定に役立つものと考えられる。今回の調査では、O25 と O78 の血清型が高率に分離されているが、医療現場では消化器症状を伴ったヒトからの分離は散見される程度である。しかし、各地域の農場から共通して検出されている現状から、食中毒事件で患者の複数からこれらの血清型が分離された場合、鶏肉等が原因となっている可能性が高いので、収去食材を詳細に検索する必要があると思われる。

薬剤感受性（耐性）試験では、シカベータテストは 31 (31/159) 株 (19.5%)、CLSIによるディスク拡散法で 32(32/159) 株 (20.1%) が ESBL 陽性を示した。また、ESBL 産生遺伝子 (TEM 型、SHV 型、CTX-M 型) の検索では、供試した 159 株中、CTX-M1 グループは 16 株 (16/159)、CTX-M2 グループは 16 株から当該遺伝子の保有が確認された。Ambler の分類でクラス A に属する ESBL である TEM 型、SHV 型は検出されなかったが、CTX-M 型が 32 株 (20.1%) 検出された。ESBL はクラス A に分類され、ペニシリン系薬剤を分解していた酵素にアミノ酸置換が生じて、第三世代、第四世代のセフェム系薬剤まで分解する能力を獲得した酵素であると知られているが、今回の TEM 型および SHV 型遺伝子の不検出については、再検討の必要があると思われた。以上のことから、食鶏の肝臓から高率に分離される大腸菌には、少なからず血清型に地域共通性があり、その大部分が多剤耐性菌であること、そして、ESBL 産生菌では、地域により分

離率に差が見られ、同じ県内でも農場別に大きな差のあることが認められた。

今後、食中毒発生時の疫学調査において、収去食材から検出される原因菌を特定するために生物学のおよび遺伝学的分析を行うことは、発生地域における原因食品の推定に有用であると考えられた。

#### D-2. 牛肝臓から分離される食中毒原因菌および肝臓内部における分布状況

今回の EHEC の検索では、牛 11 頭のと体から採取した肝臓実質、胆汁、盲腸便の全てにおいて検出されなかった。昨年度は 8 頭について同様の検索を行っているが、いずれも EHEC は不検出であった。本県の調査対象牛（肝臓、胆嚢等）では、EHEC 汚染がないか極めて低いことが分かった。一方、国内で O157 による食中毒事件が多発した 1996 年頃は、国産牛からの検出率は 1.6%前後と報告されていたが、2007～2008 年に実施された農林水産省の調査では、国内の牛飼育農場での O157 の保有率は 27.9%、個体別では 9.3%であったと報告されている。今回の調査では、肝臓実質、胆汁を対象に実施しているが、腸管内からの二次汚染は考えにくかった。今後も食中毒における原因食品を推定する目的で、牛肝臓の EHEC について継続した調査をする必要があると思われた。

カンピロバクター属菌の検索では、盲腸便からは 82%と高率に分離されており、牛の多くが腸管内に保菌していることが分かった。また、胆嚢内の胆汁および肝臓実質からも各 45%と高率に汚染されていた。肝臓の葉別では、肝管・総胆管に近接する方形葉や、離れた左葉からも本

菌が検出されており、感染牛での汚染範囲は、ほぼ肝臓全体に及んでいることが推定された。今回、11頭分の検査では、肝臓の分割区分で18ブロック中6ブロックは不検出であったので、今後の採材や検査法などの検討が必要と思われた。また、本菌の肝臓内への汚染経路は、本来腸管内に生息している菌が総胆管を經由して胆嚢内に侵入し、胆汁中で増殖し胆管を経て肝臓の各葉に到達するものと考えられている。PFGE法において同一と体の胆汁由来菌株と複数の肝臓ブロック由来菌株でDNA切断パターンが一致したことはこの説を裏付ける。また、他は同一出荷（農場）であっても、出荷時期が異なっていたこともあり同一のDNA切断パターンは見られず、農場由来菌株かどうかは不明であった。カンピロバクター属菌は、ノロウイルスに続きサルモネラ属菌と並んで食中毒の主要な原因物質となっている。平成24年7月1日から牛肝臓の生食での販売が禁止されたが、本調査での検出率からみても高濃度の汚染が明らかなので、喫食時の加熱調理には十分な注意が必要とされる。さらに今後も本菌による食中毒事件は起こり得ることが推測されるので、牛肝臓のみならず、食材等の細菌汚染の実態調査を継続していくことは、食中毒事件の疫学調査において、地域における原因食品を推定する有効な手段になると考えられた。

## E. 結論

食中毒事件における疫学調査では、市販されている食品や食材が食中毒原因物質にどの程度汚染されているのか事前に

実態を把握することは、事件の原因究明に向けての重要な手がかりとなる。また、そこから検出された原因物質の生物学的および遺伝子レベルでの科学的分析の情報は、患者便や調理従事者便等から分離された菌（原因物質）との相同性をみるうえで事件の究明には不可欠である。本研究では食中毒事件で頻繁に原因食材となり得る鶏肉と牛肝臓について、多剤耐性大腸菌、EHEC、カンピロバクター属菌の保有または汚染状況を調査した。こうした調査を継続的に実施することは、食中毒の発生地域における原因食品の推定に寄与できる極めて有用な手段であると考えられた。

謝辞：本研究の実施にあたり、検査材料の採取および調査にご協力いただいた食肉処理施設および食鳥処理施設の関係者の方々に深謝いたします。

## F. 研究発表

1. 論文発表  
なし
2. 学会発表  
なし

## G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし

**表 1 各農場におけるESBL 産生株の検出数**

農 場		菌株数	陽性数	陽性率
千葉県	A	12	7	(58.3%)
栃木県	B	13	9	(69.2%)
	C	15	1	(6.6%)
長野県	D	13	6	(46.2%)
	E	5	1	(20%)
	F	18	0	
	G	3	0	
	H	1	0	
群馬県	I	3	3	(100%)
	J	2	1	(50%)
	K	9	4	(44.4%)
	L	20	0	
	M	14	0	
	N	12	0	
	O	12	0	
茨城県	P	4	0	
	Q	2	0	
静岡県	R	1	0	
合計		159	32	(20.1%)

表 2 カンピロバクター属菌の検出状況

検出部位	と体(個体)数
検出なし	1
盲腸便のみ	4
胆汁・盲腸便	1
肝臓実質・胆汁	1
肝臓実質・盲腸便	1
肝臓実質・胆汁・盲腸便	3
合計	11

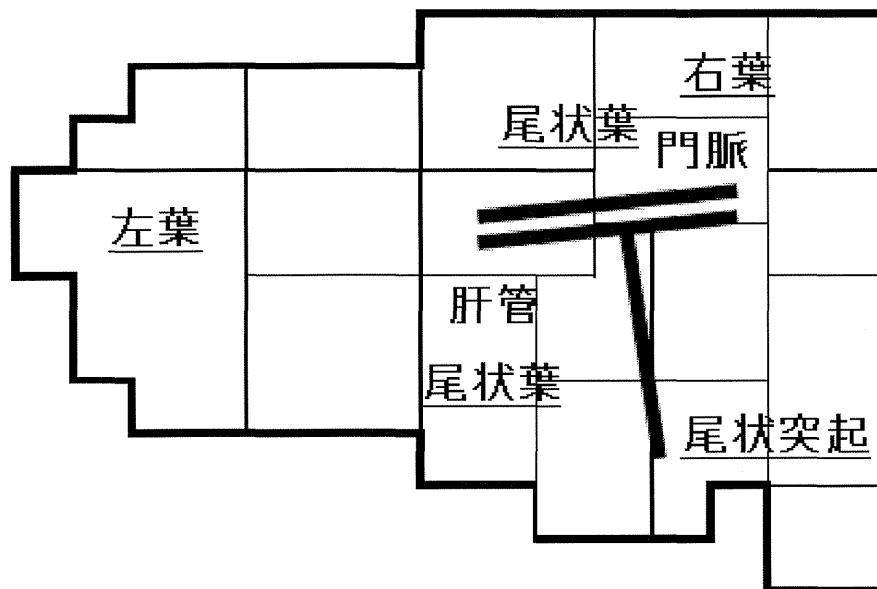


図 1 肝臓の分割区分(18ブロック)

平成 25 年度厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）

分担研究報告書

食中毒調査の精度向上のための手法等に関する調査研究

広域食中毒疫学調査ガイドラインの作成

研究分担者 杉下由行

東京都健康安全研究センター

研究協力者 高橋琢理、八幡裕一郎、砂川富正

国立感染症研究所感染症疫学センター

春日文字

国立医薬品食品衛生研究所安全情報部

#### 研究要旨

国内で自治体を越え広域散発的に発生する食中毒事例について早期の探知と介入が求められており、本研究では、調査票の共通化を進め、広域食中毒疫学調査に関するガイドラインを作成した。

作成に当たり、行政関係者等へのインタビューに加え、資料文献、各種対応マニュアル、関連法規について情報収集し、作業部会を開催した。

ガイドラインでは、事例探知、調査、解析に至るプロセスを明確にし、共通調査票による具体的な手法を明記した。このほかケーススタディを盛り込み、過去に発生した広域食中毒事例について記載した。また、今後のわが国における広域食中毒事例対応の姿について、提言としてまとめた。

広域食中毒事例の調査に関して現状では具体的な取り決めはない。本ガイドラインの策定により一定の方向性が示され、対応について共通理解が進むものと思われる。一方で、ガイドラインを踏まえた対応が各自治体で可能であるかどうか、今後、検証が必要である。さらに、解析に当たっての対照群確保などいくつかの課題が残されており、それらについて解決を目指す必要がある。また、自治体の機能を高めていくためにも提言に沿った今後の取り組みが期待される。

#### A. 研究目的

国内で自治体を越え広域散発的に発生する食中毒事例について早期の探知と介入が求められる。広域食中毒事例（疑いを含む）においては、統一した手法で効率的な調査が行われる必要が

ある。調査票の共通化を含め、広域食中毒疫学調査に関するガイドラインを作成することを本研究の目的とする。

#### B. 研究方法

行政関係者や専門家へのインタビューに加え、国内外の資料文献、各種食中毒対応マニュアル、関連法規について情報収集し、定期的な作業部会を開催した。

(倫理面への配慮)

研究に当たり、既に公表されている情報のみを収集し、個人情報を含む情報は取り扱わなかった。各種研究倫理指針に該当する項目はなく、倫理面への配慮は特段必要としなかった。

### C. 研究結果

ガイドラインでは、事例探知、調査、解析に至るプロセスを明確にし、共通調査票による具体的な手法を明記した。このほか、読み手の理解を深めるために、ケーススタディを盛り込み、過去に発生した国内外の広域食中毒事例について記載した。平成 24 年度に作成した「広域食中毒調査票に関する利用マニュアル (案)」をガイドラインに収め、平成 25 年度末にガイドラインを発刊した。また、今後のわが国における広域食中毒事例対応の姿について、提言としてまとめた (資料 1)。

### D. 考察

広域食中毒事例に関して、各自治体の食中毒対応の枠組みの中で調査が実施されているものの、現状では具体的な取り決めはない。本ガイドラインの策定により一定の方向性が示され、広域食中毒事例への対応について共通理解が進むものと思われる。一方で、ガイドラインを踏まえた対応が各自治体、各保健所で可能であるかどうか、今後、検証が必要である。さらに、解析に当たっての対照群確保や検体の分子疫学情報の共有方法などいくつかの課題が残されており、それらについて解決を目指す必要がある。

また、自治体の機能やネットワークを高めていくためにも提言に沿った今後の取り組みが期待される。

### E. 結論

広域食中毒疫学調査ガイドラインを作成し、今後に向けた展開について提言としてまとめた。

### F. 研究発表

#### 1. 論文発表

なし

#### 2. 学会発表

なし

### G. 知的所有権の取得状況

なし



## 今後に向けた広域食中毒事例対応について（提言）

広域食中毒事例（広域事例）への対応については、各自治体の自主的な取り組みを尊重しつつ、情報集約と対応については標準化という、2つの方向性の両立が必要である。本提言では、これまでの知見や国内外の情報により、その実現に必要な提言を3つにまとめた。

1. 保健所・自治体レベルでの食中毒対応能力の向上と強化
2. 自治体間ネットワークの強化
3. 国における情報集約と自治体支援機能の強化、および法整備

**(1) 保健所・自治体レベルでの食中毒対応能力の向上と強化**

全ての食中毒事例において監視・調査・対応という観点は共通であり、各保健所や自治体内におけるこれらの能力強化が欠かせない。特に、食品衛生部門と感染症部門、疫学調査部門と検査部門の連携は重要であり、関係者における定期的な体制の確認や研修の実施は、能力向上と強化に直結する。

検査診断は早期検知の鍵である。多くの地方衛生研究所で用いられているパルスフィールドゲル電気泳動（PFGE）検査は重要な分子疫学的手法であるが、結果を得るまでに時間がかかることから、迅速な菌株の解析・比較を可能とする **IS printing**、**MLVA** などの検査法が注目されている。特に **IS printing** は、**PFGE** の前段階におけるスクリーニングを目的として開発されており、迅速性における有用性が確認されつつあることから今後の導入が期待される。

広域事例対応の観点として、管内で発生した事例と周辺自治体における事例の関係について評価できる人材が必要である。その専門性については、ある程度標準化される必要があり、国立感染症研究所に設置されている実地疫学専門家養成プログラム（**Field Epidemiology Training Program: FETP**）等を利用した研修は有用である。

**(2) 自治体間ネットワークの強化**

広域事例では、自治体間の協力およびネットワーク強化が必要である。協力体制構築には、信頼関係が必要であり、日頃から顔が見える関係を作り上げることが第一歩となる。自治体間ネットワークの規模としては、北海道、東北、関東などのブロック単位が

考えられ得る。海外では、このようなブロック単位に調整役の人材配置を行うことで、効果的に対応が行なわれた例が知られている。

### (3) 国における情報集約と自治体支援機能の強化、および法整備

一案としては、厚生労働省食品安全部監視安全課食中毒被害情報管理室に、広域事例に対応する専門職員の配置が考えられる。さらに各自治体への支援としては、感染症サーベイランス（NESID）システム閲覧における守秘義務を徹底する一方で、情報共有範囲の拡大等の整備が考えられる。重症度に応じたカテゴリー分類の食品衛生法への導入や、食品由来細菌疾患や食品由来寄生虫症について感染症予防法の全数対象把握疾患への追加の検討などが法的整備の方向性として考えられる。

## II. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Jun-ichi Takanashi, Hiromichi Taneichi, Takako Misaki, Yuichiro Yahata, Akihisa Okumura, Yoh-ichi Ishida, Toshio Miyawaki, Nobuhiko Okabe, Tetsutaro Sata, Masashi Mizuguchi	Clinical and Radiological Features of Encephalopathy during 2011 E. coli O111 Outbreak in Japan.	NEUROLO GY			in press
Yoichi Kamata, Morihito Saito, Daisuke Irikura, Yuichiro Yahata, Takahiro Ohnishi, Tomoaki Bessho, Takashi Inui, Maiko Watanabe, Yoshiko Sugita-Konishi	A Toxin Isolated from Sarcocystis fayeri in Raw Horsemeat May Be Responsible for Food Poisoning.	Journal of Food Protection			in press
窪田邦宏、天沼 宏、 春日文子	公衆衛生目標に立脚 した食品衛生研究・リ スク評価と疫学から のアプローチ II-食品 由来疾患の疫学「日 本における食中毒被 害実態の疫学的手法 による推定」	食品衛生 研究	762号 (63巻 9号)	7-13	2013
窪田邦宏	食中毒の被害実態の 推定	理科資料 (実教出 版)	No.72	12-14	2012
Minoru Nidaira, Katsuya Taira, Takashi Kato, Eri Arakaki, Hisako Kyan, Taketoshi Takara, Sho Okano, Yumani Kuba, Jun Kudaka, and Mamoru Noda	Phylogenetic analysis of sapovirus from an outbreak of acute gastroenteritis in 2012 in Ishigaki Island in Okinawa, Japan	JJID			in press