

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）
「国内侵入のおそれがある生物学的ハザードのリスクに関する研究」
平成 24～26 年度総合分担研究報告書

サルモネラ、赤痢菌、コレラ菌等の細菌学的分析

研究分担者 泉谷秀昌（国立感染症研究所 細菌第一部 第二室 室長）

研究要旨

食水系細菌感染症にはサルモネラ症、赤痢、コレラなどがあり、これらは国内外でさまざまな汚染ルートを通じて多くの患者を発生させており、公衆衛生上重要な感染症である。本研究では、こうした細菌感染症を対象に、海外での流行情報を収集すること、ならびに国内侵入への対応のため、分離菌株の解析手法の検討を行うことを目的とする。サルモネラは、国内外で多くの食中毒を起こしており、欧米では国際的な流行に発展することもある。毎年、欧米を中心に輸入食品もしくは多国間にまたがる食中毒事例が報告されており、その多くはサルモネラを原因物質としていた。わが国で海外からの侵入が危惧される食水系細菌の一つである赤痢菌は毎年 100 例前後の患者を発生させている。これら分離菌株について MLVA などの分子疫学解析手法を検討し、*Shigella sonnei* についてはこれまでに 900 株近い MLVA データベースを構築できた。また、海外からの輸入食材によって食中毒が発生したナグビプリオについても、分子疫学的解析手法について検討を行った。

A. 研究目的

サルモネラ症、赤痢、コレラなどは、汚染された飲料水・食品を介して感染する経口感染症の代表的なものである。

サルモネラは、国内外で多くの食中毒の原因となっている。わが国では 1990 年代にサルモネラ食中毒のピークがあったが、現在でもなお、細菌性食中毒発生の原因物質別で上位を占めている。サルモネラは 2,500 種以上の血清型から成り、海外でも多様な原因食品を介して多くの食中毒が発生している。とくに、サーベイランス体制が確立されている欧米からの報告が多い。

細菌性赤痢は赤痢菌に汚染された食品や水を介して感染する。国内の患者発生数は年間 100 名前後であり、大半は海外渡航者による輸入例

である。しかしながら、2001 年カキ、2008 年イカを原因食品とする食中毒事例など、近年発生した集団事例の中には海外からの輸入食品との関連が示唆されたものもあった。一方で、国内例はそのほとんどが散発もしくは家族内事例などの小規模なものであり、感染源の究明にいたることはほとんどないのが現状である。細菌性赤痢は主として途上国で発生しており、菌株解析を通じて輸入例と国内例の対比を行うことは重要な工程である。

上記の現状から、本研究では、海外で発生した食中毒の情報収集とともに、分離菌株の解析を通じて国内外の流行菌型を特徴づけ、そのデータバンクの構築を行う。前者についてはサルモネラを、後者については赤痢菌を主な対象と

する。また、2013年に発生したナグビブリオの食中毒関連株について、分子疫学的解析手法の検討も行った。

B. 研究方法

海外事例の情報収集は論文雑誌・米国 CDC、欧州 CDC からの資料などを参考にした。

赤痢菌およびナグビブリオ分離株に関しては、パルスフィールドゲル電気泳動法 (pulsed-field gel electrophoresis; PFGE) もしくは複数遺伝子座を用いた反復配列多型解析 (multilocus variable-number tandem-repeat analysis; MLVA) を使用した。得られたデータを BioNumerics ソフトウェアに取り込み、データベースの構築、並びにクラスター解析を行った。

C. 研究結果および考察

・海外食中毒情報

過去 2-3 年の間に海外で発生した食中毒もしくは集団事例の中から、輸入食品もしくは複数国が関連した事例を表 1 にまとめた。表 1 に上げた 20 事例のうち 18 事例がサルモネラによるものであった。鶏肉、七面鳥など比較的良好とみられる原因食品よりも、果物、魚介類、ナッツ類などの食品が原因となることの方が多かった。また、中米、中東などの比較的途上国に由来する原因食材によるものも見られた。例えば、事例#3 は、インドから輸入されたマグロを原因食品とした事例であり、血清型も *S. Bareilly* および *Nchanga* と複数の型の菌によって汚染されていた。こうしたわが国ではあまり見かけない食材、血清型による食中毒については、今後も注視していく必要がある。

・赤痢菌分離株の解析

表 1 事例#20 にもあるように、輸入食品によ

る細菌性赤痢食中毒が海外でも発生している。2007 年にもタイ産ベビーコーンを原因食とした赤痢菌食中毒が発生したことがあり、オーストラリア、欧州などが影響を受けた。わが国でも 2001 年に輸入カキ、2008 年に輸入イカを原因食品とする赤痢菌食中毒が発生した。わが国での細菌性赤痢の多くは海外渡航による輸入例であるが、国内例も少なからず発生している。輸入例と国内例との関連性を調べることは、原因不明の国内例に関して原因究明を行う際の一助となりうる。

赤痢菌には *S. dysenteriae*, *S. flexneri*, *S. boydii*, *S. sonnei* の 4 菌種があり、わが国で発生する患者は *S. sonnei* もしくは *S. flexneri* がほとんどである。*S. sonnei* については PFGE よりも MLVA の方が解像度が高く、本研究でもその有用性を示唆するデータが得られている。一部の菌株については、輸入例の渡航地域と MLVA (および PFGE) クラスタとの相関性が示唆されているが、データベース上のデータを増やすことでその精度を上げる試みを行っている。2012-2014 年の間に約 200 株の *S. sonnei* 株を解析し、データベースに追加した。これまでのデータベースへの登録数は約 900 である。*S. sonnei* 解析で比較的良好に使われる 8 遺伝子座 (SS1,3,6,9,10,11,13,23) を用いた全体の minimum spanning tree (MST) は図 1 上のようになった。ここでは 2 遺伝子座違いのバリエーション (double locus variant) を 1 つにまとめており、比較的大きな DLV クラスタが 3 つあった。A は南アジア由来株が多く占め、B は 2012 年レストランチェーン店による国内集団事例が含まれていた。C は南アジア以外の多くの地域からの株を含んでおり、遺伝子座を追加することでより詳細に分析することが必要である。現在 20 余りの遺伝子座を試験的に使用し

ているが、例えば、Ss5 遺伝子座を追加してクラスターCを再解析すると、2010年広域国内流行株、2012年トルコツア-事例関連株、2004年ハワイ機内食事例関連株などが別クラスターになる(図1下)。このように、各遺伝子座の分解能についての評価も今後の課題であろう。

・ナグビブリオ食中毒事例株の解析

2013年9月から10月にかけてナグビブリオO144による食中毒が相次いだ。原因食としてニシ貝スライスが疑われ、その原材料は中米産であった。本事例では患者および食品からナグビブリオが検出され、患者株の大半と食品由来株の一部のPFGEパターンが一致した(図2)。これらの株を対象にMLVAを適用した。コレラ菌で使用されている7か所の遺伝子座を用いてMLVAを実施した。結果として、患者株の大半を占め、起因菌と考えられた血清群O144株は全て同じタイプであった(図3)。また、PFGEが患者株と一致した食品株も同じMLVA型であった。一方その他のマイナーな患者株および食品株のほとんどは異なる型を示した。これはPFGEの結果とほぼ一致し、本事例関連株に限ってはMLVAも有用であると考えられた。ただし、今後種々のナグビブリオに本法が対応可能かどうかについては検討すべきであろう。

D. 結論

近年の食および人のグローバル化により、海外から様々な食品および人が国内に入りやすくなっている。と同時に、食中毒菌により汚染された食品が入ってくる機会も増加していると考えられる。昨年度のナグビブリオの事例など、これまで国内ではあまり発生しなかった菌種による食中毒事例についてPFGEおよびMLVAの有効性を検討し、一定の成果は得られた。今

後の動向によっては、種々の事例に対応できるような試験系の構築を検討する必要があるだろう。赤痢菌については、地域によっては供試菌株数が少ない点もあるが、南アジア、東南アジア輸入例を中心に900株程度のデータベースが構築された。今後も、海外の発生状況の情報収集および国内の監視体制の整備、ならびに分離菌株のデータベースの拡充を図る必要がある。

菌株送付にご協力いただいた地方衛生研究所等の先生方に深謝いたします。

E. 研究発表

原著論文

- 1: Matsumoto Y, Izumiya H, Sekizuka T, Kuroda M, Ohnishi M. Characterization of *bla*_{TEM-52}-carrying plasmids of extended-spectrum-β-lactamase-producing *Salmonella enterica* isolates from chicken meat with a common supplier in Japan. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014 Dec;58(12):7545-7.
- 2: Chiou CS, Izumiya H, Thong KL, Larsson JT, Liang SY, Kim J, Koh XP. A simple approach to obtain comparable *Shigella sonnei* MLVA results across laboratories. *Int J Med Microbiol.* 2013 Dec;303(8):678-84.
- 3: Larsson JT, Torpdahl M; MLVA working group, Møller Nielsen E. Proof-of-concept study for successful inter-laboratory comparison of MLVA results. *Euro Surveill.* 2013 Aug 29;18(35):20566.
- 4: Nadon CA, Trees E, Ng LK, Møller Nielsen E, Reimer A, Maxwell N, Kubota KA, Gerner-Smidt P; MLVA Harmonization

- Working Group. Development and application of MLVA methods as a tool for inter-laboratory surveillance. Euro Surveill. 2013 Aug 29;18(35):20565. Review.
- 5: Izumiya H, Terajima J, Yamamoto S, Ohnishi M, Watanabe H, Kai A, Kurazono T, Taguchi M, Asai T, Akiba M, Matsumoto Y, Tamura Y. Genomic analysis of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium definitive phage type 104. Emerg Infect Dis. 2013 May;19(5):823-5.
- 6: 緒方喜久代、佐々木麻里、成松浩志、荒川英二、泉谷秀昌、大西真：ナグビブリオによる食中毒事例について - 大分県。IASR、第 35 巻、134-135、2014 年 5 月
- 7: 泉谷秀昌、荒川英二、森田昌知、大西真：2013 年 9～10 月に発生した食中毒事例において分離されたナグビブリオ株について。IASR、第 35 巻、136、2014 年 5 月

学会発表

- 1: 泉谷秀昌、多田有希、伊藤健一郎、齊藤剛仁、大西真：Shigella sonnei における分子疫学解析について。第 86 回日本感染症学会総会、2012 年 4 月、長崎県長崎市。
- 2: 佐々木麻里、成松浩志、緒方喜久代、荒川英二、森田昌知、泉谷秀昌、大西真：ニシ貝を原因食品とするナグビブリオによる食中毒の事例解析。第 48 回腸炎ビブリオシンポジウム、2014 年 11 月、北海道函館市。

F. 知的所有権取得状況

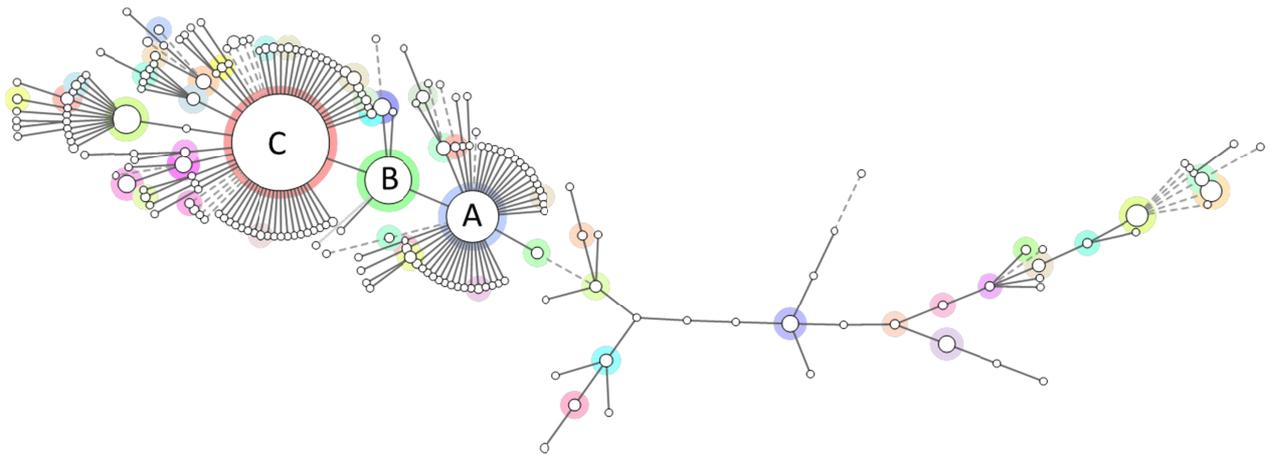
- 1 特許取得
なし
- 2 実用新案
なし
- 3 その他
なし

表 1. 主な輸出入品関連事例

#	時期	起因菌	推定原因食品	発生国	患者	死者	その他情報
#1	2012年10月	<i>Salmonella</i> Thompson	スモークサー モン	オランダ	~1000	3	オランダおよび 米国でリコール
#2	2012年7月-9 月	<i>Salmonella</i> Braenderup	マンゴー	米国	127		メキシコでパッ ク
#3	2012年1月-7 月	<i>Salmonella</i> Bareilly, Nchanga	マグロ	米国	425		インドから輸入
#4	2011年8月-12 年9月	<i>Salmonella</i> Stanley	七面鳥	オーストリ ア、ハンガ リー他7か 国	421		
#5	2011年12月	<i>Salmonella</i> Newport	スイカ	英国、ドイ ツ他6か国	54	1	
#6	2011年8月-12 月	<i>Salmonella</i> Bovismorbifica ns	タヒーニ(ゴマ ペースト)	米国	23		レバノンの製造 業者、カナダで も患者発生
#7	2011年7月-10 月	<i>Salmonella</i> Enteritidis	パインナッツ	米国	43		トルコ産
#8	2011年1月-8 月	<i>Salmonella</i> Agona	パパイア	米国	106		メキシコから輸 入
#9	2008年2月-10 月	<i>Salmonella</i> Agona	ファストフー ド	イギリス、 アイルラン ド他7か国	163	2	アイルランド A 社
#10	2013年5月	<i>Salmonella</i> Montevideo, Mbandaka	Tahini(ごま ペースト)	米国	8		トルコから輸入
#11	2013年4月	<i>Salmonella</i> Saintpaul	キュウリ	米国	81		メキシコから輸 入
#12	2013年4月	サルモネラ	ペットフード	米国			米国から輸出
#13	2013年3月	<i>Salmonella</i> Typhimurium	ペットフード	米国			米国から輸出
#14	2013年5月	<i>Salmonella</i> Saintpaul 他	カメ	米国	391		米国から輸出
#15	2013年8月	腸炎ビブリオ	ウニ	日本			中国から輸入
#16	2013年10月	<i>Salmonella</i> Heidelberg	鶏肉	米国、プエ ルトリコ	430		米国から輸出

#	時期	起因菌	推定原因食品	発生国	患者	死者	その他情報
#17	2014年1-8月	<i>Salmonella</i> Newport, Hartford, Oranienburg	チアパウダー	米国	31		カナダでも発生
#18	2013年10月 -2014年6月	<i>Salmonella</i> Newport, Hartford, Oranienburg, Saintpaul	チアパウダー	カナダ	63		米国でも発生
#19	2011-2013年	<i>Salmonella</i> Stanley	七面鳥肉	欧州	234		PFGE一致例
#20	2011年10月	<i>Shigella sonnei</i>	輸入バジル	ノルウェー	46		イスラエルからの輸入食品

図1.(上)8か所の遺伝子座を用いた MLVA 全体像。DLV を1つにまとめて表示してある。
(下) クラスタCを Ss5 遺伝子座を加えて再解析した結果。



2010広域散発

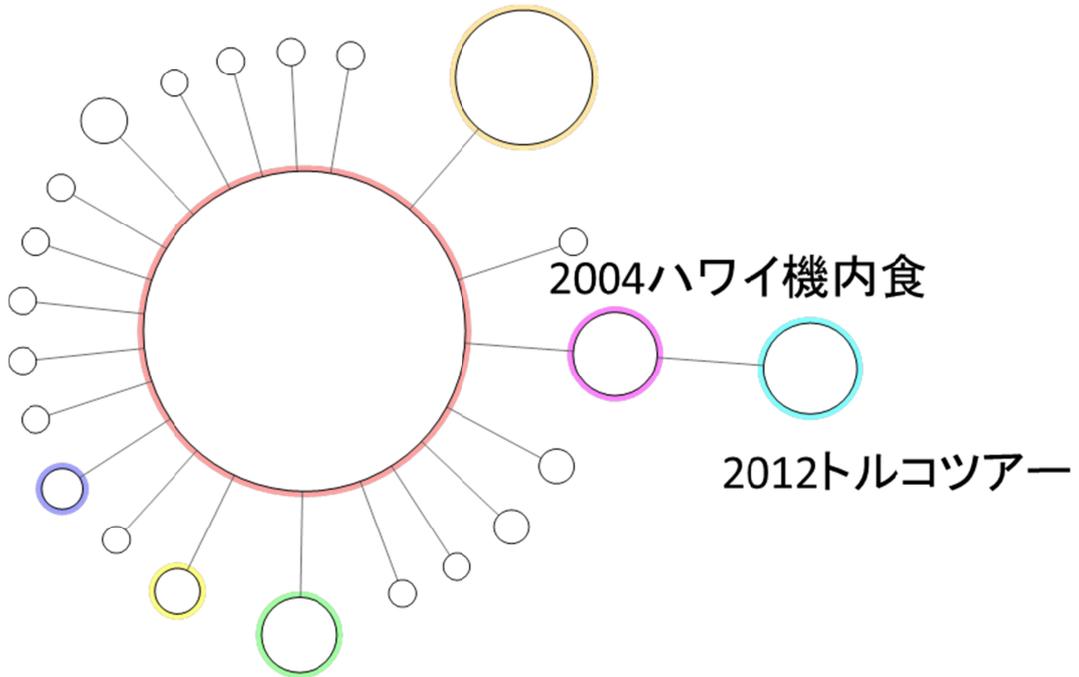


図 2 . ナグビブリオによる食中毒事例関連株の PFGE 解析。患者株には下にバーを付けてある。それ以外は食品由来株。使用制限酵素は *NotI*。

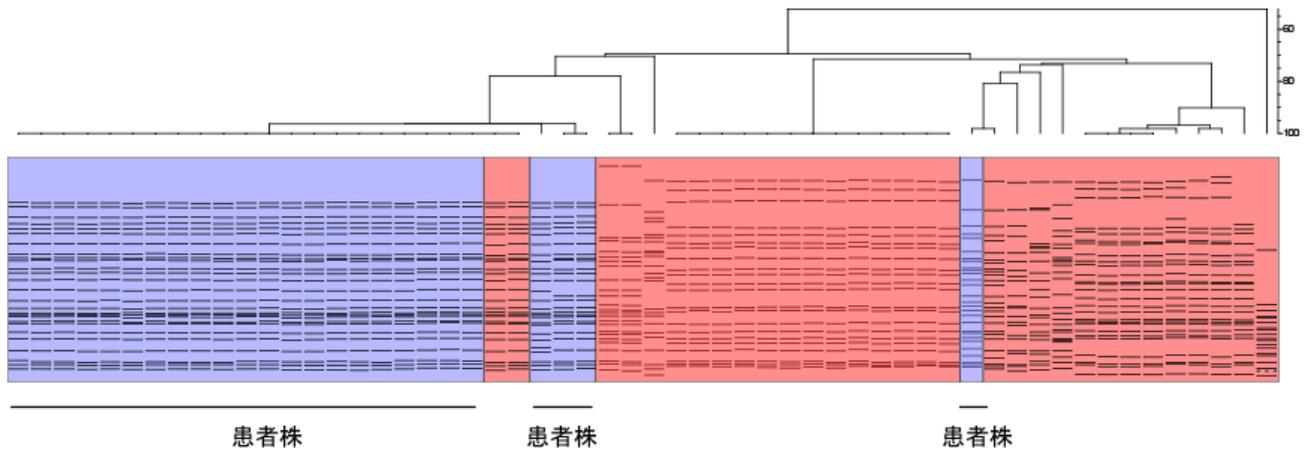


図 3 . ナグビブリオによる食中毒事例関連株の MLVA の結果。

