

201426035A

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

広域・複雑化する食中毒に対応する調査手法の
開発に関する研究

平成 26 年度 研究報告書

研究代表者 砂川 富正

平成 27 (2015) 年 3 月

広域・複雑化する食中毒に対応する調査手法の
開発に関する研究

研究代表者 砂川 富正

平成 27 (2015) 年 3 月

目次

I. 総括研究報告

広域・複雑化する食中毒に対応する調査手法の開発に関する研究

砂川 富正

..... 3

II. 分担研究報告

- 1) 広域食中毒疫学調査ガイドラインへの最新知見導入と現場での活用方法整理に関する研究

高橋 琢理

..... 27

- 2) 腸管出血性大腸菌 O157 感染症の散発事例における人口寄与危険率の算出の試み

八幡 裕一郎

..... 35

- 3) ユッケ規格基準及び牛レバー禁止後の腸管出血性大腸菌 O157 感染症散発例発生リスクの検討

八幡 裕一郎

..... 55

- 4) NESID 登録の食品媒介感染症の把握と解析に関する研究

齋藤 剛仁

..... 61

- 5) 宮城県および全国における積極的食品由来感染症病原体サーベイランスならびに下痢症疾患の実態把握（食品媒介感染症被害実態の推定）

窪田 邦宏

..... 69

- 6) 地域レベルにおける広域食中毒対策方法の導入と改善策の研究

小澤 邦壽

..... 103

- 7) 自治体における腸管出血性大腸菌感染症散発事例のリスク推定の試行

岡部 信彦／丸山 絢

..... 119

- 8) IS-printing system のマイクロチップ電気泳動装置 (MultiNA) への適応

岡部 信彦／窪村 亜希子

..... 143

- 9) ウイルスを主とした広域事例調査手法の検討

野田 衛

..... 157

10) クドア食中毒様の症状を示す原因不明食中毒に関する研究 大西 貴弘	165
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	189

I. 総括研究報告書

「広域・複雑化する食中毒に対応する調査手法の開発に関する研究」

研究代表者 砂川 富正 国立感染症研究所感染症疫学センター第二室長

研究要旨

食中毒による被害拡大・再発の防止には、食中毒の早期探知と原因究明が重要である。近年の食品流通網の広域化・迅速化・複雑化に伴い、地域において食中毒とは必ずしも認識されない広域散発事例が増加傾向にあり、原因不明食中毒事例への原因検索と対応が課題となっている。本研究は 1)広域食中毒疫学調査ガイドラインの現場での活用に関する検討、2)EHEC 散発事例を中心とした原因食品リスクと対策の効果に対する推定、3)食品媒介感染症被害実態の推定、4)地域レベルにおける広域食中毒対策方法の導入と改善策の研究、5)ウイルスを主とした広域事例調査手法検討と応用、6)クドア様症状を示す原因不明食中毒の危害物質探査を目的として研究を遂行した。

1. 食中毒疫学調査ガイドラインの活用に関する検討：広域食中毒事例の検出・調査手法のためのガイドラインを策定し、見直しを行った。実際の広域事例に基づいてガイドラインの検証を行い、1)広域事例の場合にヘッドクォーター機能を担う自治体についての記載、2)流行曲線の作成方法についての解説、3)初期対応の解説、の三点について不足がみられ、これらに関する改訂が必要であった。ここ数年で引退する方の多いベテランの食品衛生監視員から聞き取り方法の伝承が必要である。

2. 腸管出血性大腸菌 O157 感染症の散発事例における人口寄与危険率の算出の試み：腸管出血性大腸菌 O157 感染症の散発例の発症リスクの検討および人口寄与危険割合の算出を症例対照研究により行った。「プールなどの利用」、「公設水道」、「国内旅行」、「肉類の喫食」、「内臓肉の喫食」、「牛肉（半生）」、「牛肉（十分に加熱）」、「ユッケ（生）」、「牛レバー（生）」、「牛レバー（十分に加熱）」、「牛ホルモン（十分に加熱）」、「豚肉（十分に加熱）」、「豚ホルモン（十分に加熱）」は粗のオッズ比及び性別で調整したオッズ比が有意であった。人口寄与危険割合は「牛肉（十分に加熱）」が 56.3%で最も大きく、次いで、「プールなどの利用」が 17.2%、「牛肉（生または半生）」が 12.3%

の順であった。今後は同一遺伝子型とそれ以外に分けた症例対照研究等の実施による早期対策へ向けての検討が課題である。

3. ユッケの規格基準改定および牛生レバーの提供禁止の影響を判定するため、腸管出血性大腸菌 O157 感染症の発生リスクを経年的に評価した。2012 年は対策の効果がみられたものの、2013 年、2014 年は生または半生の牛肉の喫食および生または半生の牛レバーがリスクとなった。規制後時間の経過で喫食者がみられた。生または半生の牛肉・牛レバーがリスクであることに對する改めての普及啓発が重要である。

4. NESID 登録の食品媒介感染症の把握と解析に関する研究：感染症発生动向調査 (NESID) で報告された疾患のうち、3 類および 4 類感染症から食品媒介感染症の特徴について検討を行った。腸チフスは 2000 年以降初めて食中毒事例が発生し、腸管出血性大腸菌感染症 (EHEC) は大規模食中毒や広域事例が発生した。西日本を中心に同一遺伝子株の A 型肝炎が流行したが、原因は不明であった。今後、NESID データを中心としたモニタリングの継続、早期検出の方法に関する研究を継続することが必要である。

5. 宮城県および全国における積極的食由来感染症病原体サーベイランスならびに下痢症疾患の実態把握 (食品媒介感染症被害実態の推定)：食中毒として報告されない散発発症患者を含めた胃腸炎疾患の患者数推定を目的として実施された。宮城県の検査機関および医療機関から下痢症検便検体からの病原体の検出、夏期および冬期の住民調査からの検便実施率および医療機関受診率を求め、モンテカルロシミュレーション法により *Campylobacter*、*Salmonella*、*Vibrio parahaemolyticus* の 3 菌株について、宮城県内及び全国の患者数推定を行った。

6. 地域レベルにおける広域食中毒対策方法の導入と改善策の研究：広域・複雑化する食中毒に対応する調査手法の開発に関する研究として、地域レベルにおける腸管出血性大腸菌 (EHEC) 感染の迅速な探知、食中毒対策に有用と考えられる疫学研修と市販食材の調査の課題を設定し、検討した。EHEC 感染症の早期探知・診断システムの構築は保健所、医療機関の協力を得て実施した。結果の報告は検体搬送から概ね 2 日であった。本システムは迅速な情報還元が可能であることが確認された。市販食材の食中毒原因菌による汚染状況調査は捕物肉からサルモネラ O7 群、鶏ひき肉から病原大腸菌 O18、鶏胸肉からサルモネラ O7 群、野菜類の白菜、人参、馬鈴薯、ほうれん草、ごぼうからセレウス菌が検出された。野菜類は生食用、加熱用の区別がなく

市販されており、購入者の嗜好により、食中毒の危険性や二次汚染の可能性が否定出来ない。今後も食中毒対策として原因菌汚染が高いと推測される市販食材を調査し、継続的に情報提供することが必要である。感染症・食中毒担当者を対象とした疫学研修の実施は定期的な開催と疫学に関する講義の他、実践に則したグループワーク形式のスタイルの研修を希望する担当者が多かった。

7. 自治体における腸管出血性大腸菌感染症散発事例のリスク推定の試行：自治体におけるアトリビューションの算出を川崎市で行った。食品を取り扱う仕事、保育関係の仕事、屋外プールの利用、肉類の喫食、馬肉ユッケ／馬刺しの喫食、半生の牛肉の喫食、十分加熱された牛肉が腸管出血性大腸菌 O157 感染症の散発例のリスクとして算出された。データ収集に時間を要することから、迅速なアウトブレイク発生時の対策への応用は課題である。本調査の結果は長期的な対策には利用可能であると考えられた。

8. IS-printing system のマイクロチップ電気泳動装置 (MultiNA) への適応：O157 の分子疫学解析に用いられる IS-printing 法 (IS 法) に、より迅速性の高いマイクロチップ電気泳動装置 (Multi NA) を用いるための検討を行った。解析法は importladder に比べサンプル測定時に同時測定を行った ladder が誤差が少ない良好な結果となった。PCR 後の増幅遺伝子の濃度の検討で、高濃度サンプルを希釈した場合の測定がゲルイメージにおいて positive control とのズレが小さく、誤判定の低減が確認された。

9. ウイルスを主とした広域事例調査手法の検討：食品媒介性ウイルスによる散在型アウトブレイク事例 (diffuse outbreak) を早期に探知するには、当該ウイルスの塩基配列を比較し、相同性・異同性を調べるのが有用であるが、その解析は必ずしも簡便ではない。ローカル Blast 検索を簡便に実行するプログラムを開発した。このプログラムにより、国内で検出されているウイルスの遺伝学的相同性の迅速な解析が可能となった。実際の事例に適応することにより、迅速な散在型アウトブレイク事例の探知に寄与できるものと考えられた。

10. クドア食中毒様の症状を示す原因不明食中毒に関する研究：本研究によりヒラメ生食による原因不明有症苦情事例は *Kudoa septempunctata* が原因であることを明らかにしてきたが、ヒラメ以外の食材における原因は明らかでない点が多い。本研究は 1)ヒラメ以外の魚種による原因不明有症苦情の原

因を明らかにすること、2) *K. septempunctata* に対する LAMP 法の作成、3) ウマヅラハギの *K. septempunctata* の寄生の検討、4) ヒラメを原因食とする有症苦情事例でクドア胞子が検出されない事例の病因物質の検討を行った。ヒラメ以外の魚の原因不明有症苦情の原因としては、*Kudoa thyrsites* と *Kudoa minithyrsites* の DNA が検出された。次年度はこの系を利用し、事例検体に含まれる微生物の DNA 解析を行う。*K. septempunctata* の LAMP 法を作成し、通知法の代替法として感度が高かったことから感度の調整を改めて行う予定である。

研究分担者

小澤 邦寿	群馬県衛生環境研究所所長
野田 衛	国立医薬品食品衛生研究所 食品衛生管理部室長
窪田 邦宏	国立医薬品食品衛生研究所 安全情報部室長
八幡裕一郎	国立感染症研究所感染症 疫学センター主任研究官
岡部 信彦	川崎市健康安全研究所所長
大西 貴弘	国立医薬品食品衛生研究所 衛生微生物部室長
齊藤 剛仁	国立感染症研究所感染症 疫学センター研究員
高橋 琢理	国立感染症研究所感染症 疫学センター研究員

A. 研究目的

A-1. 広域食中毒疫学調査ガイドラインへの最新知見導入と現場での活用方法整理に関する研究

近年、広域流通食品の汚染による広域食中毒事例（広域事例）が報告され、その検出には時間を要する場合が多い。これ

まで、厚生労働科学研究補助金食品の安全確保推進研究事業で「広域食中毒疫学調査ガイドライン」（ガイドライン）を 2014 年 3 月 31 日に策定した。本研究は実際の現場で活用について検討を行った。

A-2. 腸管出血性大腸菌 O157 感染症の散発事例における人口寄与危険率の算出の試み

我が国の腸管出血性大腸菌感染症の発生动向は年間 3500 例-4500 例で推移している。腸管出血性大腸菌 O157 の散発例のリスク及び人口寄与危険割合の検討を行い、O157 散発例の対策の優先順位の検討を行った。

A-3. ヌッケ規格基準及び牛レバー禁止後の腸管出血性大腸菌 O157 感染症散発例発生リスクの検討

腸管出血性大腸菌感染症の多くは散発例である。我が国では 2011 年にヌッケの規格基準の改正及び 2012 年に生レバーの提供禁止が施行された。これらの対策の

効果について継続的なモニタリングが必要である。本研究は対策後の腸管出血性大腸菌 O157 の散発例における牛肉、牛肉臓肉及びミンチ肉の喫食による発症リスクについて 2012 年以降の推移について検討した。

A-4. NESID 登録の食品媒介感染症の把握と解析に関する研究

感染症発生動向調査（NESID）に報告される全数疾患から 3 類および 4 類感染症のアウトブレイク事例の情報解析を行い問題点の検討を行い今後の食中毒予防対策とすることを目的とする。

A-5 宮城県および全国における積極的食品由来感染症病原体サーベイランスならびに下痢症疾患の実態把握（食品媒介感染症被害実態の推定）

我が国の食品由来感染症の患者数は散発例が含まれていないため患者数が正確に把握されていないことが示唆される。散発例を含めた食中毒による被害実態の全容を把握することが重要である。米国では FoodNet により食中毒による被害実態の把握はアクティブサーベイランスにより行われているが、我が国では行われていない。これまで実施している宮城県の被害実態の推定と全国の被害実態の推定を比較し、推定手法の検討を継続して行った。

A-6. 地域レベルにおける広域食中毒対

策方法の導入と改善策の研究

A-6-1. 腸管出血性大腸菌感染症の早期探知・早期診断システムの構築

腸管出血性大腸菌（EHEC）による感染症や食中毒事件は重症化する症例が発生する可能性が高いこと、食材・食品の流通形態では広域に及ぶことが有り、迅速な菌株の解析情報や疫学情報を関係機関で把握し、共有することが重要である。EHEC 感染症の早期探知・早期診断システムの構築を試みた。

A-6-2. 市販食材における食中毒原因菌による汚染状況調査

地域における市販食材の細菌汚染の実態を把握し、関係機関へ情報提供することは地域における食中毒の発生を未然に防止するばかりでなく、食中毒事件の原因究明に向けた調査で重要な手がかりになることが期待できることから、地域の複数の店舗から購入した食材の食中毒原因菌汚染状況調査を実施した。

A-6-3. 感染症・食中毒担当者を対象とした疫学研修の実施とその評価

広域食中毒疫学調査ガイドラインが策定されたが、担当者の技術などに依存する可能性が高く、人材育成が急務である。本研究は地域レベルにおける広域食中毒対策方法を修得するための研修会を開催し、研修の効果及び評価を行った。

A-7. 自治体における腸管出血性大腸菌

感染症散発事例のリスク推定の試行

欧米では腸管出血性大腸菌（EHEC）感染症対策に **Attributable risk percent**（アトリビューション）を算出し、対策を行っている。我が国では全国のアトリビューション算出は可能であることが示唆された。一方自治体では症例数が少なく、リスク評価が困難であることから対策が検討されていないのが現状である。本研究は自治体における実施の可能性について検討を行った。

A-8. IS-printing system のマイクロチップ電気泳動装置（MultiNA）への適応

IS-printing System（IS法）は腸管出血性大腸菌 O157 の遺伝子に存在する複数の異なる IS（insertion sequence）を解析する方法である。PCR 後の遺伝子の検出はマイクロチップ電気泳動装置（MultiNA）を用いることでサンプル数が多い場合にも迅速な結果が得られ、ゲル電気泳動後のバンド画像に似せたゲルイメージにも自動変換されるため結果の確認も容易である。本研究は MultiNA を用いた測定による IS法の解析の信頼性について検討を行った。

A-9. ウイルスを主とした広域事例調査手法の検討

食品媒介ウイルスによる感染症は自治体間にわたる散在型アウトブレイク事例を早期探知し、共通の汚染食品や感染経路等を特定し、被害拡大防止対策のために

疫学情報と患者から検出された病原体遺伝子情報を自治体間で共有することが重要である。散在型アウトブレイク事例の早期探知等の広域事例調査の精度向上への寄与を目的に BLAST 検索システムの開発を試みた。

A-10. クドア食中毒様の症状を示す原因不明食中毒に関する研究

近年、生鮮食品を共通食とする原因物質不明の有症苦情事例報告が全国で増加している。これらの事例は一過性の下痢や嘔吐で、重症例はいない。これらの事例は患者の喫食残品から既知の食中毒微生物や化学物質などが検出されないか検出されても一致しない事が特徴である。また、ヒラメ（*Kudoa septempunctata*）や馬肉（*Sarcosystis fayeri*）以外では有症苦情の多くが散発的な事例で、十分な検討ができていなく、メタゲノム解析にはコストが非常にかかる。そこで、本研究は原因物質が微生物であると仮定の下、**Denaturing Gradient Gel Electrophoresis**法（DGGE法）を用いて解析を行う。また、現在実施されている *K. septempunctata* の検査方法は煩雑であるため、安価で迅速な検査方法が求められているため、1 個体のヒラメを対象に定性下限が暫定検査法（1g あたり 10^5 孢子）に準じた感度になる検査方法の改良を行う。

B. 研究方法

B-1. 広域食中毒疫学調査ガイドライン

への最新知見導入と現場での活用方法整理に関する研究

ガイドラインの活用の検討はケース・スタディー実施、実際の広域事例をもとに調査手法のシミュレーション、自治体担当者からの意見収集を行った。

B-2. 腸管出血性大腸菌 O157 感染症の散発事例における人口寄与危険率の算出の試み

研究デザインはマッチングした症例対照研究を行い、協力の得られた 8 自治体で発生した散発症例を症例とし、対照はインターネット調査に参加を希望し、症例と年齢階級及び居住地をマッチさせた者とした。条件付きロジスティック回帰分析を行った。単変量で有意なリスクに対し、多変量解析で有意な項目に対して人口寄与危険割合を算出した。

B-3. ユッケ規格基準及び牛レバー禁止後の腸管出血性大腸菌 O157 感染症散発例発生リスクの検討

対策の効果は 2010 年及び 2012 年以降に算出された散発例のオッズ比を過去の報告書および本年度の報告書から収集し、継続的な生または半生の牛肉及び牛レバーのリスクの変化について検討した。

B-4 NESID 登録の食品媒介感染症の把握と解析に関する研究

宮城県内の医療機関が便検査を依頼している検査機関の協力を得て宮城県内の菌

検出情報を収集した。また、宮城県内の医療機関が検査を依頼している民間検査機関 3 社より全国の菌検出データを収集した。全国を 10 地区に区分し、人口割に応じてサンプル数を一般家庭から RDD (Random Digit Dialing) 法でランダムに選択し電話調査を行った。電話調査は症状、化学療法の有無、妊娠月経期間、発症時の医療機関受診の有無、受診時の検便実施の有無、入院の有無、仕事あるいは学校の欠席の有無、欠席期間を収集した。解析は推定モデルを作成し、@RISK ソフトウェア (Palaside 社) で算出した。

B-5. 宮城県および全国における積極的食品由来感染症病原体サーベイランスならびに下痢症疾患の実態把握 (食品媒介感染症被害実態の推定)

NESID より 2014 年診断第 1 週～第 52 週までの間に患者の性別、年齢、診断日、推定感染地、推定感染源、感染原因である病原体とその血清型や毒素型の、遺伝子型等の情報を収集した。また、自治体で公表されたプレスリリースなども収集した。

B-6. 地域レベルにおける広域食中毒対策方法の導入と改善策の研究

B-6-1. 腸管出血性大腸菌感染症の早期探知・早期診断システムの構築

平成 26 年 11 月より群馬県内の保健所 (中核市 2 保健所含む) 及び医療機関の連携

し、診察した医師が血便を伴う EHEC 感染症を疑った場合に通常の検査に加え群馬県衛生環境研究所で迅速検査を行うこととした。

B-6-2. 市販食材における食中毒原因菌による汚染状況調査

平成 26 年 10 月から群馬県内で野菜等の食材を販売する 4 店舗より肉類、野菜類、鶏卵、魚介類等 47 品目を購入し、GLP 標準作業書に基づいて検査を実施した。

B-6-3. 感染症・食中毒担当者を対象とした疫学研修の実施とその評価

群馬県の保健所の感染症・食中毒担当者を対象とした研修を行い、研修会の実施方法、テーマ及び研修形式に対する調査をメールで実施した。

B-7. 自治体における腸管出血性大腸菌感染症散発事例のリスク推定の試行

マッチングした症例対照研究を用いた。調査機関は 2014 年 7 月 1 日から 11 月 31 日までに川崎市内で散発例として報告された腸管出血性大腸菌 (EHEC O157, O26, O111) 感染症患者を症例とした。症例からの情報収集は研究班で作成した標準調査票を利用した。対照はインターネット調査会社に登録し、研究班調査への参加同意者とし、症例の年齢階級及び居住地 (郵便番号紙 3 桁) を一致させた男女 10 人ずつを無作為に抽出した。なお、解析の際、対照群のうち下痢、血便のあ

るもの、本人または同居家族が EHEC 感染症と診断されたものは除外した。オッズ比は Conditional logistic regression analysis で算出した。

B-8. IS-printing system のマイクロチップ電気泳動装置 (MultiNA) への適応

2013 年に分離された腸管出血性大腸菌 O157 菌株 5 株を供試菌株とした。MultiNA による IS 法の測定に用いる試薬の検討、1st 及び 2nd set primer sample の測定結果の解析方法 (1st set の ladder 検討、2nd set の positive control との比較のためのチップ間の検出サイズ誤差の検討)、ゲルイメージによる結果解析に適したサンプルの検討、高濃度遺伝子増幅産物を得るための検討、測定サンプルの希釈倍率の検討を行った。

B-9. ウイルスを主とした広域事例調査手法の検討

システムの開発は Windows (64 ビット) 上で動作するシステムとし、遺伝子データの分析は遺伝子型、検出年月日、株名、塩基配列情報等を収集した。

B-10. クドア食中毒様の症状を示す原因不明食中毒に関する研究

B10-1. 有症苦情事例残品中の微生物 DNA 網羅的解析方法の作成

シイラの検体から真核生物の 18S リボゾーム DNA に特異的な二組のプライマーセット及び原核生物の 16S リボゾーム

DNA に特異的なプライマーセットを用いて PCR を行った。DGGE は電気泳動を行い、SYBR Safe DNA gel stain 出染色し、DNA 抽出後シーケンス解析を行った。得られた塩基配列の由来は BLAST 検索を行い決定した。

B10-2. ウマヅラハギにおける *K. septempunctata* 寄生状況調査

ウマヅラハギは全国の市場から天然ものを購入した。*K. septempunctata* の暫定法に従い採材し、DNA 検出は水産庁の検査法に従い PCR を行い、PCR で陽性になった場合、厚生労働省の暫定法に従い定量 RT-PCR 法による *Kudoa* DNA コピー数を測定した。

B10-3. *Kudoa* 胞子が検出されないヒラメ有症苦情事例の原因究明

福岡県で発生したヒラメが原因食材と疑われる有症苦情事例の検体を用いた。暫定通知法による定量的 PCR 法で 1g あたり 10^6 - 10^7 コピーの *K. septempunctata* が検出されたが胞子が検出できなかったため、Proteinase K で抗原の不活化を行った後、Biotin-Blocking System 及び Protein Blocking Serum free でブロッキングし、Alexa Fluor 594 Goat anti-chicken IgG と反応させ、Slow Fade Gold antifade reagent with DAPI で封入後、蛍光顕微鏡で観察した。

B10-4. *K. septempunctata* に対する

LAMP 法の作成

K. septempunctata の LAMP 法は生成クドア胞子の TritonX 可溶化抗原のアミノ酸配列をもとに LAMP 法プライマーを 1g あたり 10^5 胞子を定性下限となるように感度を調整して作成し、妥当性評価を 4 機関で実施した。

C. 結果

C-1. 広域食中毒疫学調査ガイドラインへの最新知見導入と現場での活用方法整理に関する研究

ケース・スタディーは概ね 2 時間半強ですべての設問を回答することが可能であることが明らかになった。広域事例ではない事例について収載する必要性が認められた。実際の広域事例で検証を行い、1) 広域事例の場合にヘッドクォーター機能を担う自治体についての記載、2) 流行曲線の作成方法についての解説、3) 初期対応の解説、の三点に不足がみられた。また、食品衛生監視員より、聞き取り調査が個人によりばらつきが生じており、ベテランの食品衛生監視員から良い聞き取り方法の伝承が必要であるとの指摘があった。台湾、米国、韓国、日本で行われたシンポジウムで広域事例の対応について情報収集を行った。

C-2. 腸管出血性大腸菌 O157 感染症の散発事例における人口寄与危険率の算出の試み

腸管出血性大腸菌 O157 感染症発症との

関連は「同居家族で下痢」、「同居家族で血便」、「同居家族で腸管出血性大腸菌感染症」、「食品を取り扱う仕事」、「保育関係の仕事」、「プールなどの利用」、「公設水道」、「国内旅行」、「肉類の喫食」、「内臓肉の喫食」、「牛肉（半生）」、「牛肉（十分に加熱）」、「ユッケ（生）」、「牛レバー（生）」、「牛レバー（十分に加熱）」、「牛ホルモン（十分に加熱）」、「豚肉（十分に加熱）」、「豚ホルモン（十分に加熱）」、「鶏肉（生）」、「鶏肉（半生）」、「鶏肉（十分に加熱）」が粗のオッズ比及び性別で調整したオッズ比が有意であった。

曝露と腸管出血性大腸菌 O157 感染症発症の散発例の人口寄与危険割合算出は「牛肉（十分に加熱）」が 56.3%で最も大きく、次いで、「プールなどの利用」が 17.2%、「牛肉（生または半生）」が 12.3%の順であった。

C-3. ユッケ規格基準及び牛レバー禁止後の腸管出血性大腸菌 O157 感染症散発例発生リスクの検討

生または半生の「牛肉の喫食」は規制前の 2010 年と規制後の 2013 年、2014 年が O157 発症と有意に発症と関連し、規制直後の 2012 年に生または半生の「牛肉の喫食」は O157 発症と有意な関連はなかった。生または半生の「牛挽肉」は O157 発症と有意な関連は規制前後の全ての年で O157 発症と有意な関連がなかった。生または半生の「牛レバー」は規制前の 2010 年及び規制後の 2014 年に O157 発

症と有意な関連があり、規制後の 2012 年及び 2013 年に有意な関連がなかった。

C-4. NESID 登録の食品媒介感染症の把握と解析に関する研究

3 類感染症はコレラが海外渡航者から報告が継続している。細菌性赤痢は微増、国内感染例は微増であったが、幼稚園での *Shigella sonnei* のアウトブレイクが報告された。EHEC は直近 5 年で最多となった。特に、静岡県の花火大会の露店で提供された冷やしキュウリが原因食品である事例で 500 人以上の症例が発生した。この他に EHEC は馬刺しを原因食品とする食中毒事例が発生した。冷やしキュウリの事例も馬刺しの事例も原因は不明であった。腸チフスは 2000 年以降で初めて食中毒事例として報告された。パラチフスは 2013 年がカンボジアへの渡航者によるものであり、2014 年は海外渡航者であった。4 類感染症は A 型肝炎および E 型肝炎の患者数が増加した。A 型肝炎は 2-3 月に症例の報告がベースラインを大きく超え、過去 10 年で最も多い報告数となった。九州・瀬戸内海を中心に患者が報告され、主なウイルス株は I A 型で同一由来株の流行であったが、原因は不明である。E 型肝炎はブタ、シカ、イノシシが原因であった。

C-5. 宮城県および全国における積極的食品由来感染症病原体サーベイランスならびに下痢症疾患の実態把握（食品媒介

感染症被害実態の推定)

全国の 2006 年～2013 年における下痢症患者の実患者数の推定は *Campylobacter* が 5,984,945 人～14,167,733 人、*Salmonella* が 1,056,277 人～2,437,543 人、*Vivrio parahaemolyticus* が 131,894 人～563,902 人であった。宮城県のデータから全国の 2006 年～2013 年における下痢症患者の実患者数の推定は *Campylobacter* が 4,787,956 人～11,334,186 人、*Salmonella* が 1,003,463 人～2,315,666 人、*Vivrio parahaemolyticus* が 85,731 人～366,537 人であった。全国の 2006 年～2013 年における人口 10 万人あたりの下痢症疾患の患者数は *Campylobacter* が 4,694 人～11,112 人、*Salmonella* が 829 人～1,912 人、*Vivrio parahaemolyticus* が 442 人～103 人と推定された。全国の 2006 年～2013 年における人口 10 万人あたりの下痢症の食品由来患者数は *Campylobacter* が 3,755 人～8,890 人、*Salmonella* が 787 人～1,816 人、*Vivrio parahaemolyticus* が 67 人～288 人と推定された。

C-6. 地域レベルにおける広域食中毒対策方法の導入と改善策の研究

C-6-1. 腸管出血性大腸菌感染症の早期探知・早期診断システムの構築

2 例が疑い例として報告され、EHEC の検査を実施し、2 例とも VT 遺伝子の保有は認められなかった。2 例とも検体が搬入されてから概ね 2 日で結果が報告された。

C-6-2. 市販食材における食中毒原因菌による汚染状況調査

47 検体のうち、8 検体 (17%) から食中毒原因菌が検出された。食材は鶏モモ肉 1 検体からサルモネラ O7 群、鶏ひき肉 1 検体から病原大腸菌 O18、鶏ムネ肉からサルモネラ O7 群、野菜類の白菜、にんじん、馬鈴薯、ほうれん草、ごぼうからセレウス菌が検出された。セレウス菌は嘔吐毒遺伝子の保有があり、下痢毒の産生は陰性であった。大腸菌群と一般生菌数は漬け物 2 検体でキャベツ漬けが大腸菌群 3,000 /g 以上、一般生菌数 3,000 /g 以上、茄子カット漬けが大腸菌群 3,000 /g 以上、一般生菌数 3,000 /g 以上、カッテージチーズが大腸菌群 0 /g、一般生菌数 11,700 /g、ゴーダチーズが大腸菌群 0 /g、一般生菌数 2,440 /g、鮭切り身 (加熱用) が大腸菌群 15 /g、一般生菌数 4,750 /g、海藻類の切り昆布、戻しワカメが大腸菌群 0 /g、一般生菌数がそれぞれ 1,100 /g、1,620 /g であった。

C-6-3. 感染症・食中毒担当者を対象とした疫学研修の実施とその評価

質問票を送付した 41 名中 22 名 (54%) から回答が得られた。研修会の効果は「役に立った」が 82% (18/22)、研修会の開催は「毎年実施するべき」が 91% (20/22) で高かった。研修会テーマの希望は「積極的疫学調査」が 82% (18/22)、「データ解析手法」が 64% (14/22) であった。開

催方法の希望は「講義とグループワーク形式」が 86% (19/22) であった。

C-7. 自治体における腸管出血性大腸菌感染症散発事例のリスク推定の試行

EHEC O157 症例は 26 人、対照は 240 人であった。EHEC O157 発症と有意な関連は食品を取り扱う仕事、保育関係の仕事、屋外プールの利用、肉類の喫食、馬肉ユッケ／馬刺しの喫食、半生の牛肉の喫食、十分に加熱された牛肉の喫食、十分に加熱された牛レバーの喫食、十分に加熱された牛ホルモンの喫食、十分に加熱された豚ホルモンの喫食、ネギの喫食、パセリの喫食及びキムチの喫食であった。

C-8. IS-printing system のマイクロチップ電気泳動装置 (MultiNA) への適応

各 ladder の解析による検出遺伝子サイズの誤差は増幅サイズに比例して大きくなる傾向がみられた。ゲルイメージとして表示した場合も ladder により解析を行った場合はズレが少ない傾向が認められた。ladder による解析はバンドの遺伝子サイズが大きくなるのと比例し、誤差が大きくなる傾向にあった。PCR 反応液全体量は株によるばらつきが認められた。定法に準拠した PCR 反応液に template を 1.0、2.5 μ l、5.0 μ l 添加したサンプルは全ての濃度で定法に比べ高い信号強度を示し、濃度が高いサンプルはゲルイメージが確認しやすかった。希釈を行った場合は信

号強度が低くなった。

C-9. ウイルスを主とした広域事例調査手法の検討

系統樹解析や BLAST 検索等の遺伝子データ分析には FASTA 形式のデータが用いられることから、構築したデータベースを FASTA 形式として排出できる機能を持たせた。また、FASTA ファイルをエクセル形式に変換できる機能、エクセルから FASTA ファイルへの変換機能をもたせた。新たに解析された株の追加登録がデータベース上で可能になるようにした。

C-10. クドア食中毒様の症状を示す原因不明食中毒に関する研究

C-10-1 有症苦情事例残品中の微生物 DNA の網羅的解析方法の作成

原因物質特定のために DGGE 方を用いたメタゲノム解析の応用をシイラが原因食として疑われた 2 事例に対して試みた。事例 2 の検体から *K. minithyrsites* と *K. thyrsites* が検出されたが事例 1 からは検出されなかった。原核生物事例は事例 1,2 から *Brochothrix* 属、*Pseudomonas* 属などの腐敗細菌が共通して検出された。事例 1 から *Serratia* 属が検出された。参考品からは *Chryseobacterium* 属、*Burkholderia* 属、*Listeria* 属、*Clostridium* 属などが分離された。

C-10-2. ウマツラハギにおける *K*

***sempunctata* 寄生状況の調査**

ウマヅラハギ 31 尾中 1 尾あたり 2 箇所から DNA を抽出し、2 尾から PCR 陽性となった。シーケンスの結果、1 尾から *K. thyrsites* の寄生が確認された。もう 1 尾は *K. sempunctata* か否か確認中である。個体から Kudoa DNA のコピー数は 10^3 – 10^4 コピー/g であった。

C-10-3. Kudoa 孢子が検出されない有症苦情事例の原因究明

ヒラメ組織を *K. sempunctata* 特異的抗体で染色し、ヒラメ組織中の *K. sempunctata* 細胞の検出を試みた。特異的抗体と DAPI で染色される約 5–10 μ m の細胞が組織中に認められ、細胞は組織全体に認められ、局所的に集中して存在している箇所もあったが孢子や多核体と思われる細胞は認められなかった。

C 10-4. *K. sempunctata* に対する LAMP 方の作成

LAMP 方を改良し、 1.8×10^4 孢子のクドアが検出できることが明らかとなった。

D. 考察

D-1. 広域食中毒疫学調査ガイドラインへの最新知見導入と現場での活用方法整理に関する研究

実際の広域事例で検証からガイドラインは 1) 広域事例のヘッドクォーター機能を担う自治体に関する指針を明記し、2) 流行曲線の作成方法について記載をコラ

ムなどに書き込み、3) 初期対応の解説を記載することが必要であると考えられた。今後はガイドラインの改定のみならず、e-learning の活用なども視野に入れた改定の検討が必要である。

D-2. 腸管出血性大腸菌 O157 感染症の散发事例における人口寄与危険率の算出の試み

「牛肉（十分に加熱）」は人口寄与危険割合が最も高く、腸管出血性大腸菌 O157 感染症の発症対策のための最優先事項であると考えられた。焼き肉での交差汚染や十分に加熱したつもりが、十分に加熱されてない状態であったことなどが発症に関与していた可能性が考えられた。十分に加熱をするための知識、態度、信念等の要因を向上させることが今後の対策として必要であると考えられた。

D-3. ユッケ規格基準及び牛レバー禁止後の腸管出血性大腸菌 O157 感染症散发例発生リスクの検討

生肉に関する規制が行われ、2012 年は規制の効果がみられた。一方で、2013 年及び 2014 年は生または半生の牛肉の喫食及び生または半生の牛レバーの喫食が O157 発症と有意な関連があった。生の牛肉は症例が 104 人中 3 人 (3%)、半生の牛肉は喫食者が症例 102 人中 12 人 (12%) 喫食しており、何らかの形で喫食者が存在していた。規制のみならず、生肉または半生肉の喫食が O157 発症のリスクが

あることの普及及び啓発が必要であると
考えられる。

D-4. NESID 登録の食品媒介感染症の把握と解析に関する研究

2014 年に、2000 年以降初めて腸チフスの食中毒が報告された。食品取扱従事者の衛生管理が重要である。花火大会の露店で販売された冷やしキュウリが EHEC に汚染され、提供されたアウトブレイクが発生した。また、馬刺しが EHEC に汚染されたアウトブレイクが発生した。これらの EHEC 事例は原因不明であるが、非加熱食品の提供には EHEC 等の汚染による食中毒の発生の可能性があることから衛生管理が重要である。細菌性赤痢は幼稚園での集団発生が報告された。国内例はあまり報告されていないことから、国内例の発生報告が 1 例でもある場合には迅速な対応が必要であると考えられた。

D-5. 宮城県および全国における積極的 食品由来感染症病原体サーベイランスな らびに下痢症疾患の実態把握（食品媒介 感染症被害実態の推定）

宮城県のデータから食品由来下痢症患者数は食中毒統計や病原微生物検出情報の数値より大幅に多いことが確認できた。本研究の推定と食中毒患者報告数は経年変化が連動していないことから経年変動等を評価することは困難であることが示唆されたため、今後年ごとの検討が必要である。平常時から散发事例等を含めた

データ収集の継続が重要である。また、菌検出、下痢症発生率、医療機関受診率および検便実施率等の情報を継続して調査することで、アウトブレイクの影響を最小限にすることが可能であるため継続して本研究を実施することが必要である。

D-6. 地域レベルにおける広域食中毒対策方法の導入と改善策の研究

D6-1. 腸管出血性大腸菌感染症の早期探知・早期診断システムの構築

EHEC O157 が原因の集団食中毒は重症化を伴う発生が見られ、EHEC を原因菌とする感染の早期察知、関係機関で疫学情報を共有することは二次感染など感染拡大防止に有用な手段と考えられる。本研究は EHEC の早期システムを構築し、当初の計画とほぼ一致する結果が得られた。今後、地域の保健所や医療機関との連携を深め、EHEC を原因とする食中毒や感染症の早期探知や対策に効果が期待できると考えられた。

D-6-2. 市販食材における食中毒原因菌による汚染状況調査

本研究では地域レベルで市販食材における食中毒原因菌（13 菌種）による汚染状況調査を実施し、鶏肉類（サルモネラ O7 群、病原大腸菌 O18）、野菜類の 5 品目からセレウス菌が検出された。これら野菜類は生食用、加熱用の区別なく市販されて、購入者の嗜好、調理法によっては生で食される可能性がある。野菜類は

二次汚染や土壌由来の細菌等が多く付着しているため、衛生的な取扱い、十分な洗浄と加熱調理が必要と考えられた。今後も広域食中毒対策方法として、危険性がある市販食材について調査を継続予定である。

D-6-3. 感染症・食中毒担当者を対象とした疫学研修の実施とその評価

地域における広域アウトブレイク対策方法として、群馬県内保健所担当者の共通認識を得るため、研修会を開催し、その評価を行った。うち、3名は「研修会を毎年実施するべき」と回答し、ある程度の効果があったと考えられた。今後の研修会は「積極的疫学調査」が最も多い希望があったことは、調査の経験が少ないことや、自身の調査方法の確認をしたいなどの要因が考えられる。「データ解析手法」は後ろ向きコホート研究なのか、症例対照研究なのかといった、理解しにくい研究手法をどのように使ってデータを解析したらいいのかという疑問が要望につながっていると考えられる。これまでも、講義とケース・スタディを実施してきたが、グループワーク形式による方法は、他の担当者の意見を聞きことができるという点で有効な開催方法であると確認された。研修会は、多くの食中毒及び感染症担当者が必要性を認めている研修なので、それぞれの要望を把握しながら、地域レベルにおける広域食中毒対策方法の導入に向け、継続して実施する必要がある

あると考えられた。

D-7. 自治体における腸管出血性大腸菌感染症散発事例のリスク推定の試行

肉類の喫食は全国と類似の傾向が見られた。食品を取り扱う仕事は定期検便が実施され、健康状態を注視していることが要因の一つと考えられるとともに、感染拡大予防となっていると考えられ、定期検便の継続的徹底が必要である。保育関係の仕事は食品取扱者であったため、食品取扱従事者と同様の衛生教育を行う必要があると考えられた。

D-8. IS-printing system のマイクロチップ電気泳動装置 (MultiNA) への適応

サンプル解析に必要な ladder は ladder 自体にかかる時間や、測定後に手動による設定が必要になるなど解析終了までに時間を要するが、誤判定の提言に繋がる結果となった。チップ間の誤差は大きな違いは認められなかったが、チップによる誤差はチップ自体の使用回数や状態に左右されるため、極端に使用回数の異なるチップによる測定結果の比較は避けるべきである。IS 法は極端に信号強度が異なるとゲルイメージのコントラストに影響を及ぼす可能性があるが、template 作成で、各バンドの信号強度が高くなったと同時にサンプル内でのばらつきが低減された可能性が示唆された。本結果から ladder の LM を主導で設定する際の人為的ミスや機器がサンプルの