

201522028A

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

食品での新たな病原大腸菌の
リスク管理に関する研究

平成27年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 工藤 由起子

国立医薬品食品衛生研究所 衛生微生物部

平成28(2016)年3月

目 次

I. 総括研究報告書

食品での新たな病原大腸菌のリスク管理に関する研究	3
------------------------------------	---

工藤 由起子

II. 分担研究報告書

1. 食中毒・感染症事例由来株の特性解析	17
--------------------------------	----

小西 典子

2. 食品での統一的検査法の開発	29
----------------------------	----

工藤 由起子

(1) 腸管毒素原性大腸菌の検査法の基礎検討 1	37
------------------------------------	----

(2) 腸管毒素原性大腸菌の検査法の基礎検討 2	67
------------------------------------	----

3. ヒトの感染に関与する家畜の探索	81
------------------------------	----

西川 禎一

III. 研究成果の刊行に関する一覧表	115
-------------------------------	-----

I. 総 括 研 究 報 告 書

食品での新たな病原大腸菌の リスク管理に関する研究

工藤 由起子

平成27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）

食品での新たな病原大腸菌のリスク管理に関する研究

研究代表者 工藤由起子 国立医薬品食品衛生研究所

総括研究報告書

研究分担者 小西 典子 東京都健康安全研究センター

西川 禎一 大阪市立大学大学院生活科学研究科

研究要旨

食品中の病原大腸菌（下痢原性大腸菌）の検査法を開発するために、分担研究（1）食中毒・感染症事例由来株の特性解析、（2）食品での統一的検査法の開発、（3）ヒトの感染に関与する家畜の探索を実施した。これらの結果から、東京都で発生した腸管毒素原性大腸菌下痢症および食中毒統計での腸管毒素原性大腸菌食中毒発生状況を解析し、上位7血清群の06、025、027、0148、0153、0159、0169が本菌の主要血清群であると考えられた。また、本菌の国内での食中毒には野菜・その加工品や水が重要であり、人、環境・水、家畜、調理場での二次汚染が関与し、海外渡航感染者や輸入食品も汚染経路の一端となっていることが推察された。さらに、食品での検査の検討については、食品培養液からの遺伝子スクリーニングが有用であることが食中毒事例での検査状況から示され、腸管出血性大腸菌の食品での検査法と共通してmEC培地での42℃培養が腸管毒素原性大腸菌にも適すること、易熱性エンテロトキシン遺伝子・耐熱性エンテロトキシン遺伝子を対象としたリアルタイムPCR法が食品検体でも検出感度に優れることが判明し、検出率を向上させる選択性のある分離平板培地や免疫磁気ビーズの開発が課題であることが明らかになった。さらに、腸管毒素原性大腸菌0169:H41の病原プラスミドの全塩基配列を決定し、本プラスミドが異なる宿主に対応できる定着因子をコードしており、0169の感染適応力を増強する上で大きく寄与していることが示唆された。本研究では、今後さらに、本菌の食品の汚染経路の解明および食品での検査法の確立を進めていきたい。

研究協力者

甲斐明美

東京都健康安全研究センター

尾畑浩魅

東京都健康安全研究センター

平井昭彦

東京都健康安全研究センター

坂 瑛里香

大阪市立大学大学院生活科学研究科

吉田優香

大阪市立大学生生活科学部

涌嶋美津子	大阪市立大学大学院生活科学研究科
輪島丈明	東京薬科大学薬学部
濱端 崇	国立国際医療センター研究所
市川直樹	大阪市立大学大学院生活科学研究科
安倍博之	大阪大学微生物病研究所
堀口安彦	大阪大学微生物病研究所
中臺枝里子	大阪市立大学大学院生活科学研究科
山本太郎	長崎大学熱帯医学研究所
和田崇之	長崎大学熱帯医学研究所
大塚佳代子	埼玉県衛生研究所
門脇奈津子	埼玉県衛生研究所
星野 梢	埼玉県衛生研究所
榊田 希	埼玉県衛生研究所
大阪美紗	埼玉県衛生研究所
阪田理沙	国立医薬品食品衛生研究所
高田 薫	国立医薬品食品衛生研究所
都丸亜希子	国立医薬品食品衛生研究所
寺嶋 淳	国立医薬品食品衛生研究所

A. 研究目的

2012年に感染症報告数集計において、下痢原性大腸菌(食中毒統計の病原大腸菌)の分類が新たな分類に改訂された。この新たな病原大腸菌の分類は、その判定のための病原因子またはマーカーが明示され、患者から分離された大腸菌株の病原大腸菌としての同定・判定が行いやすくなった。このため、食中毒事例での原因食品や汚染食品の調査に有用な方法が必要とされる。しかし、腸管出血性大腸菌以外の病原大腸菌についての食品での検査法は、これまで、国内外ともにあまり検討されておらず、早急な確立が求められている。

食中毒統計における病因物質「その他の病原大腸菌」のうちの腸管毒素原性大腸

菌による食中毒の発生は、年間の事例数は数件程度であることが多いが、多くの集団事例が報告され、患者数の多い事例が発生することが少なくないことが知られている。しかし、食品での検査法が確定されていないため、原因食品の調査や流通食品の汚染調査などにおいて有用な方法が求められている。なお、腸管出血性大腸菌については、既に食品での検査法(食安監発1120第1号 平成26年11月20日発「腸管出血性大腸菌 026、0103、0111、0121、0145 及び 0157 の検査法について」、平成27年3月24日事務連絡)が通知されており、試験手順や培地などの一部が、この検査法と共通であれば効率的で効果的な検査法と考えられる。腸管毒素原性大腸菌は

その病原性が明確であり、新たな病原大腸菌の判断基準に沿った食品での検査法を確立し、国の試験法の策定に貢献する。また、諸外国から参照される方法を確立したい。また、検査の対象として重要と考えられるヒトの感染に関与する家畜・食品群についても、ヒトと家畜での共通の病原因子を明らかにすることによって解明したい。

研究組織としては、(1) 食中毒・感染症事例由来株の特性解析(小西典子)、(2) 食品での統一的検査法の開発(工藤由起子)、(3) ヒトの感染に関与する家畜の探索(西川禎一)の3つの分担研究とした。

平成 27 年度には、(1) 厚生労働省食中毒統計や詳細な事例解析を行っている東京都の疫学データなどから腸管毒素原性大腸菌による食中毒および下痢症発生状況を解析し、本菌の主要血清群を考察した。また、(2) 腸管出血性大腸菌の食品での検査法との共通性を考慮し、増菌培養法および選択分離培地、本菌の病原因子であるエンテロトキシン(易熱性エンテロトキシン; LT、耐熱性エンテロトキシン; ST) の遺伝子を対象としたリアルタイム PCR 法を検討した。(3) 血清群 O169 の菌株について、病原プラスミドの全塩基配列を決定し異なる宿主に対応できる定着因子に関して検討した。

B. 研究方法

(1) 食中毒・感染症事例由来株の特性解析

- 1) 東京都における腸管毒素原性大腸菌による集団下痢症の発生状況(1966 年から 2014 年) および分離株の特徴

を解析した。

- 2) 散発下痢症患者(2012 年から 2014 年) から分離された大腸菌 1,063 株について毒素産生性、血清型などの特徴を解析した。
- 3) 2011 年 9 月に東京都を中心とした 7 自治体の関連するネギを原因食品とした O148:H28(ST 産生) による腸管毒素原性大腸菌食中毒事例での食品を対象とした本菌の検出状況について解析した。
- 4) 過去に発生した集団下痢症事例で食品から腸管毒素原性大腸菌が検出された事例について解析した。

(2) 食品での統一的検査法の開発

- 1) 腸管毒素原性大腸菌食中毒における主要血清群および関連する食品群の解析

厚生労働省食中毒統計、食中毒事件詳細や国立感染症研究所・病原微生物検出情報(IASR) による情報から本菌の主要血清群や関連する食品群を解析した。

- 2) 食品での腸管毒素原性大腸菌増菌培養法および選択分離培地の検討

1. 増菌培養条件の検討として、腸管出血性大腸菌で使用されている mEC 培地に接種し 36℃ および 42℃ での 18 時間培養後の増殖を試験した。

2. 選択分離培地の検討として、ソルビトールマッコンキー寒天培地、DHL 寒天培地、ドリガルスキー改良培地などを検討し、また新たな有用な選択剤についてフェノタイプマイクロアレイにて探索した。

- 3) 食品での ST および LT 遺伝子検出リアルタイム PCR 法の検討

1. 検出感度の検討として、腸管毒素原性大腸菌の主な血清群の菌株培養液の希釈菌液をミニトマト、大根の漬物、長ネギ、生わかめなどの食品培養液に加えた試料を使って検討した。
 2. 食品での検出性の検討として、ミニトマト、大根の漬物、長ネギ、生食用ボイルわかめに 25 g に菌を接種（約 10^2 cfu/g）し、増菌培養、遺伝子スクリーニング法、分離培養法の一連の検査法による本菌の検出を検討した。
 - (3) ヒトの感染に関与する家畜の探索
 - 1) 菌株のアミノ酸配列解析

腸管毒素原性大腸菌 0169:H41（下痢症患者由来、YN10 株）、0159（下痢症患者由来、IND 株）、078:H11（国際標準株、H10407）を供した。いずれも毒素遺伝子である *est* (STp) を保持していた。各菌株からプラスミド DNA を抽出し、シーケンス解析にて 150 のコンティグ（塩基配列断片群）情報として得た。アミノ酸配列に基づいた系統発生樹を作成した。
 - 2) 菌株の付着性試験

HEp-2 細胞を培養し供試菌株の培養液を接種し、3 時間培養後に、細胞をギムザ染色した。
 - 3) ヒトおよび家畜からの病原因子の探索

大阪府および兵庫県での下痢症患者便、健康者便、食用鶏の盲腸便、ブタの便を検査に供した。各検体の増菌培養液からの DNA 抽出物を用いて、各種リアルタイム PCR 法（*stx1*・*stx2*・*eae* トリプレックス、*stx1*・*stx2* デュプレックス、*est* (STp・STh)・*elt* トリプレックス、*est* (STp)・*est* (STh) デュプレックス、*aggR*・*astA* デュプレックス、*virB*・*afaB* デュプレックス）を行なった。これによって、病原大腸菌陽性と判定された増菌培養液からコロニー・ハイブリダイゼーション法にて病原大腸菌の分離を行った。
- C. 研究結果
- (1) 食中毒・感染症事例由来株の特性解析
 - 1) 東京都における腸管毒素原性大腸菌による集団下痢症は、1991～2000 年の 10 年間には非常に多く発生しているが、2001 年以降はやや減少傾向であった。06、025、027、0148、0159、および 0169 の 6 血清群で全体の 86.3% を占めていた。
 - 2) 散发下痢症患者からの大腸菌分離株の 7.2% が LT、ST のいずれか一方あるいは両毒素産生菌であった。患者の多くはインド、インドネシア、中国等海外渡航の関連が考えられた。
 - 3) 食中毒事例での保存検体の 2 倍乳剤を mEC 培地での 37℃ および 42℃ での 2 段階増菌法に供し、また、増菌培養液からの毒素遺伝子検出や自家製 0148 免疫磁気ビーズでの濃縮法を組み合わせて検査した結果、ネギまたはネギが使用された食品から腸管毒素原性大腸菌 0148 (ST 産生) が分離された。
 - 4) 原因食品は野菜関連が 4 事例、1 事例は杏仁豆腐であった。

(2) 食品での統一的検査法の開発

1) 腸管毒素原性大腸菌食中毒における主要血清群および関連する食品群の解析

06、025、027、0148、0153、0159、0169 が上位 7 血清群であり、これらが主要血清群と考えられた。海外渡航での感染事例の血清群もこれらに含まれるものが多かった。原因食品は野菜が最も多く、半数以上を占め、次に水が多かった。

2) 食品での腸管毒素原性大腸菌増菌培養法および選択分離培地の検討

1. 増菌培養条件の検討として、腸管出血性大腸菌で使用されている mEC 培地での 42℃培養にて良好な増殖が認められた。

2. 選択分離培地の検討として、供試した寒天培地で概ね菌株間の差が無く生育が認められた。ただし、セフィキシム・亜テルル酸添加によって生育は抑制された。また、新たな有用な選択剤として 2 種類の薬剤の可能性が示唆された。

3) 食品での ST および LT 遺伝子検出リアルタイム PCR 法の検討

1. 検出感度の検討として、試験した食品 4 種類および供試菌株 3 株すべてで 10^3 cfu 以上/mL で両遺伝子が検出された。

2. 食品での検出性の検討として、全食品ともに全接種菌株で分離平板培地にて分離することができた。ただし、生食用ボイルわかめでは、コロニーの鑑別が効率的ではなかった。また、TaqMan Environmental Master Mix の使用でも、良好な結果が得ら

れた。

(3) ヒトの感染に関与する家畜の探索

YN10 株のプラスミド (pEntYN10) の全塩基配列解析の結果、全長 145,082 bp で、GC 含量は、46.15 %であり RepFII プラスミドファミリーに属することが分かった。他の RepFII ファミリーのヒト ETEC プラスミドと比較して、プラスミドの安定性に関する遺伝子が少ないことが分かった。推定定着因子の 3 遺伝子群を保有していた。*faeG* の配列の系統発生樹では、これらの 2 つの *faeG* は、他の大腸菌株よりも *Salmonella* *Infantis* のものと近いことが分かった。また、0159 IND 株の定着因子の検討を行ったところ、0159 IND も pEntYN10 と同じ CS8-like および K88-like 遺伝子を保有することが示された。本株の K88-like は、pEntYN10 の K88-like と 99% 一致していた。

D. 考察

(1) 食中毒・感染症事例由来株の特性解析

東京都で発生した集団および散发下痢症事例では、腸管毒素原性大腸菌の血清群 06、025、027、0148、0159、0169 が多く、食品を対象とした検査法を確立するためには、まずはこの 6 血清群を対象とするのが妥当であろうと考えられた。また、散发患者の多くは下痢の発症前にインド、インドネシア、中国等への海外渡航が認められ、これらの国では生水や加熱されていない食品の接種には注意が必要である。また、これらの地域から輸入される食品も、本菌に汚染されている可能性が考えられる。

東京都で発生した食中毒事例での食品（カットネギ等）保存品の増菌培養液を PCR 法で ST 毒素遺伝子をスクリーニングし、陽性検体の mEC 培地での二段階増菌培養液から 0148 の分離を行うことができた。また、自家調製した免疫磁気ビーズを用いて集菌することで、検出が可能となった検体もあった。今後の検査法の参考になると考えられた。

腸管毒素原性大腸菌を検出した事例の原因食品をみると、野菜を使用した食品が多いことが明らかとなった。

（２）食品での統一的検査法の開発

過去の国内における食中毒では、O 血清群 06、025、027、0148、0153、0159、0169 による事件の発生が多いこと、食中毒原因食品として野菜・その加工品や水が重要であり、それらの汚染経路として人、環境・水、調理場での二次汚染が考えられた。また、海外渡航での感染事例も国内での発生事例での血清群と重なることから、海外渡航者が患者または健康保菌者として国内での汚染経路の一端となっていることも、考えられた。さらに、腸管毒素原性大腸菌の感染が発生している地域で生産された農産物など輸入食品が汚染経路の一端となっていることも推察される。これらの情報は、今後の食品での試験法の確立において、対象とする血清群を設定し、試験対象食品も考慮して検討するにあたって、有用な情報となる。

本菌の主要血清群の増菌培養について検討し、mEC 培地、42℃で発育することが判明した。本培養条件は、すでに通知で示されている食品からの腸管出血性大腸菌

検査法と同一な増菌培地で、同一の培養温度である。そのため、市販食品の汚染調査において、病原機構の異なる複数の病原大腸菌検査を並行して行うことができ、検査の効率性を高め、また検査費用の削減にもなる。また、感度の良好なリアルタイム PCR 法が確認されたことから、今後、食品検体を増やして検討する予定である。さらに、分離培地について今後、腸管毒素原性大腸菌に適した選択性を保有する分離培地の開発が必要と考えられた。

（３）ヒトの感染に関与する家畜の探索

pEntYN10 プラスミドの維持に関係する遺伝子は少なく、0169 が容易にプラスミドを落とす理由と考える。また、pEntYN10 は、CS6、CS8、K88(F4)-like の 3 種の定着因子候補遺伝子群を保有していたが、本菌では電子顕微鏡観察でも CS8 様の線毛は観察されておらず、in vitro での細胞接着には他の CS8-like や K88-like のいずれかが主に働いている可能性が考えられた。また、pEntYN10 の K88-like 遺伝子群の主要線毛サブユニットをコードする *faeG* は、ブタ由来株よりも、ヒト由来の *Salmonella enterica* serovar Infantis の *faeG* と近いことが分かったことから、pEntYN10 の K88-like がヒトへの感染のために働いている可能性も考えられる。

腸管毒素原性大腸菌はヒトのみならずブタやウシの下痢症原因ともなるが、腸粘膜への定着因子が異なるため、家畜の ETEC は家畜の間で、ヒトの ETEC はヒトの間だけで感染を循環しているとされている。しかしながら、in vitro では脱落し

やすいプラスミドを 0169 が保つという事実は、本菌が常に効率よく感染を繰り返し in vivo で保たれていることを示唆する。本プラスミド上にコードされた 3 種の定着因子遺伝子を使い分けることによって 0169 が多様な宿主に感染する能力を得ているのかもしれない。家畜とヒトの間で腸管毒素原性大腸菌の感染が起こっていないのか、新しい視点で調べ直す必要性が示唆された。

E. 結論

食品中の病原大腸菌（下痢原性大腸菌）の検査法を開発するために、分担研究（1）食中毒・感染症事例由来株の特性解析では、①東京都で発生した腸管毒素原性大腸菌下痢症では血清群 06、025、027、0148、0159、0169 が主要であること、②散发下痢症患者の多くはインド、インドネシア、中国等海外渡航の関連が考えられること、③食品での検査は食品培養液からの遺伝子スクリーニングが有用であること、④原因食品として野菜を使用した食品が多いこと、が明らかになった。また、（2）食品での統一的検査法の開発では、①腸管毒素原性大腸菌食中毒発生状況を解析し、上位 7 血清群の 06、025、027、0148、0153、0159、0169 が本菌の主要血清群であり、東京都の主要血清群の全てが含まれていたこと、②腸管出血性大腸菌の食品での検査法との共通性を考慮し、mEC 培地での 42℃培養が優れること、検出率を向上させる選択性のある分離平板培地や免疫磁気ビーズの開発が課題であること、③検討したリアルタイム PCR 法は検出感度に優れ

た毒素遺伝子検出法であること、が判明した。さらに、（3）ヒトの感染に関与する家畜の探索では、腸管毒素原性大腸菌 0169:H41 の病原プラスミドの全塩基配列を決定したところ、本菌には CS6、CS8-like、K88-like の 3 種類の腸管定着因子がコードされ、異なる宿主に対応するなど 0169 の適応力増強に本プラスミドが寄与しているのかもしれない。家畜とヒトの間で腸管毒素原性大腸菌の感染が起こっていないのか、新しい視点で調べ直す必要性が示唆された。

本研究では、本菌の食中毒にはまた、本菌の国内での食中毒には野菜・その加工品や水が重要であり、人、環境・水、家畜、調理場での二次汚染が関与し、海外渡航感染者や輸入食品も汚染経路の一端となっていることが推察された（図 1）。今後さらに、本菌の食品の汚染経路の解明および食品での検査法の確立を進めていきたい。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Kobayashi, N., Maeda, E., Saito, S., Furukawa, I., Ohnishi, T., Watanabe, M., Terajima, J. and Hara-Kudo, Y. Association of cell-adhesion activities with virulence in Shiga toxin-producing *Escherichia coli* 0103:H2. *Biocontrol Science*. 21: 57-61, 2016.

Negoro, S., Shimohata, T., Hatayama, S.,

- Sato, Y., Matsumoto, M., Iba, H., Aihara, M., Uebanso, T., Hamada, Y., Nishikawa, Y., Yamasaki, S., Mawatari, K., Takahashi, A. (2014) *Campylobacter jejuni* infection suppressed Cl⁻ secretion induced by CFTR activation in T-84 cells. J. Infect. Chemother. 20 (11): 682-688. DOI: 10.1016/j.jiac.2014.07.007.
- Ban, E., Yoshida, Y., Wakushima, M., Wajima, T., Hamabata, T., Ichikawa, N., Abe, H., Horiguchi, Y., Hara-Kudo, Y., Kage-Nakadai, E., Yamamoto, T., Wada, T., and Nishikawa, Y. (2015) Characterization of unstable pEntYN10 from enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) O169:H41. Virulence 6(8):735-744. doi: 10.1080/21505594.2015.1094606.
2. 学会発表
- 星野 梢、鈴木史恵、山崎匠子、小西典子、菊地理慧、岩渕香織、永井佑樹、磯部順子、山田裕子、坂本 綾、上田泰史、森 哲也、中川 弘、大塚佳代子、工藤由起子. 食品における腸管出血性大腸菌 6 血清群試験法のコラボレイティブスタディによる評価. 第19回腸管出血性大腸菌 (EHEC) 感染症研究会. 平成 27 年 7 月. 東京.
- 森 哲也、長尾清香、岸野かなえ、難波豊彦、高田 薫、工藤由起子. 腸管出血性大腸菌の食品からの検出における DNA 抽出法および遺伝子検出法の検討. 日本防菌防黴学会第 42 回年次大会. 平成 27 年 9 月. 大阪.
- 石川暢子、齋藤明美、吉田信一郎、市川希美、森 哲也、伊藤 武、池本尚人、加藤一郎、林 伸之、工藤由起子. ゼリー飲料および固形化成分を含有する粉末清涼飲料の細菌試験法の問題点とその改善法の検討. 第36回日本食品微生物学会学術総会. 平成 27 年 11 月. 川崎.
- 大塚佳代子、森 哲也、上田泰史、中川 弘、清水大輔、甲斐明美、小西典子、長尾清香、寺嶋 淳、工藤由起子食品の腸管出血性大腸菌検査における VT 遺伝子検出機器及び試薬の検討. 第 36 回日本食品微生物学会学術総会. 平成 27 年 11 月. 川崎.
- Noju, T., Matsuzaki, T., Tamai, S., Tanimoto, Y., Kage-Nakadai, E., and Nishikawa, Y. Diffusely adherent *Escherichia coli* (DAEC) strains isolated from healthy carriers inhibit IL-8 secretion of HEK293 cells stimulated by inflammatory substances. *E. coli* and the Mucosal Immune System, Ghent, Belgium, Abstract: 29 2015/7/10-13.
- Ban, E., Yoshida, Y., Ikezaki, S., Zheng, D., Kage-Nakadai, E., Wada, T., Wajima, T., Hamabata, T., Horiguchi, Y., Ichikawa, N., Hara-Kudo, Y., and Nishikawa, Y. Complete DNA sequence of the virulence plasmid of enterotoxigenic *Escherichia coli* O169:H41 and characterization of a novel adherence factor. *E. coli* and the Mucosal Immune System, Ghent,

- Belgium, Abstract: 47 2015/7/10-13.
- Mamun, Md. M., Parvej, Md. S., Hassan, J., Nazir, KHM N. H., Nishikawa, Y., and Rahman, Md. T. Detection of Shigatoxigenic *Escherichia coli* in healthy broiler chicken and their public health significance. Applied and Environmental Microbiology Gordon Research Conference, Boston, USA 2015/7/11-17.
- Tamai, S., Noju, T., Tanimoto, Y., Matsuzaki, T., Kage-Nakadai, E., Yamaguchi, Y., Kodama, T., Nakamura, S., Motooka, D., Iida, T., and Nishikawa, Y. Inhibitory effects of diffusely adherent *Escherichia coli* strains isolated from healthy carriers on cytokine secretions of epithelial cells stimulated by inflammatory substances. The 14th Awaji International Forum on Infection and Immunity, Awaji Yumebutai International Conference Center, Japan, Abstract: 87. 2015/9/8-11.
- Nakatani, Y., Yaguchi, Y., Kashima, N., Komura, T., Kage-Nakadai, E., Terao, K., and Nishikawa, Y. (2015) Sesamin prolongs lifespan of *Caenorhabditis elegans* through regulation of genes related to caloric restriction. The 3rd International Conference on Model Hosts, Crete, Greece, Abstract: 29. 2015/9/19-24.
- 中村寛海、田口真澄、井口 純、西川禎一. 食品製造施設における自由生活性アメーバおよび *Listeria monocytogenes* の分布、第 88 回日本細菌学会総会、平成 27 年 3 月 26-28 日 岐阜大学 長良川国際会議場 一般演題 P2-120.
- 中谷裕美子、西川禎一. セサミンによる *Caenorhabditis elegans* (線虫) の寿命延長メカニズムの解明、日本食品免疫学会第 11 回学術大会、平成 27 年 10 月 15-16 日 東京大学 ポスター発表 P-31 p. 47.
- 西川禎一. *Caenorhabditis elegans* (線虫) における乳酸菌の抗老化効果、日本食品免疫学会第 11 回学術大会、平成 27 年 10 月 15-16 日 東京大学 シンポジウム講演 S3-4 p. 15.
- H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

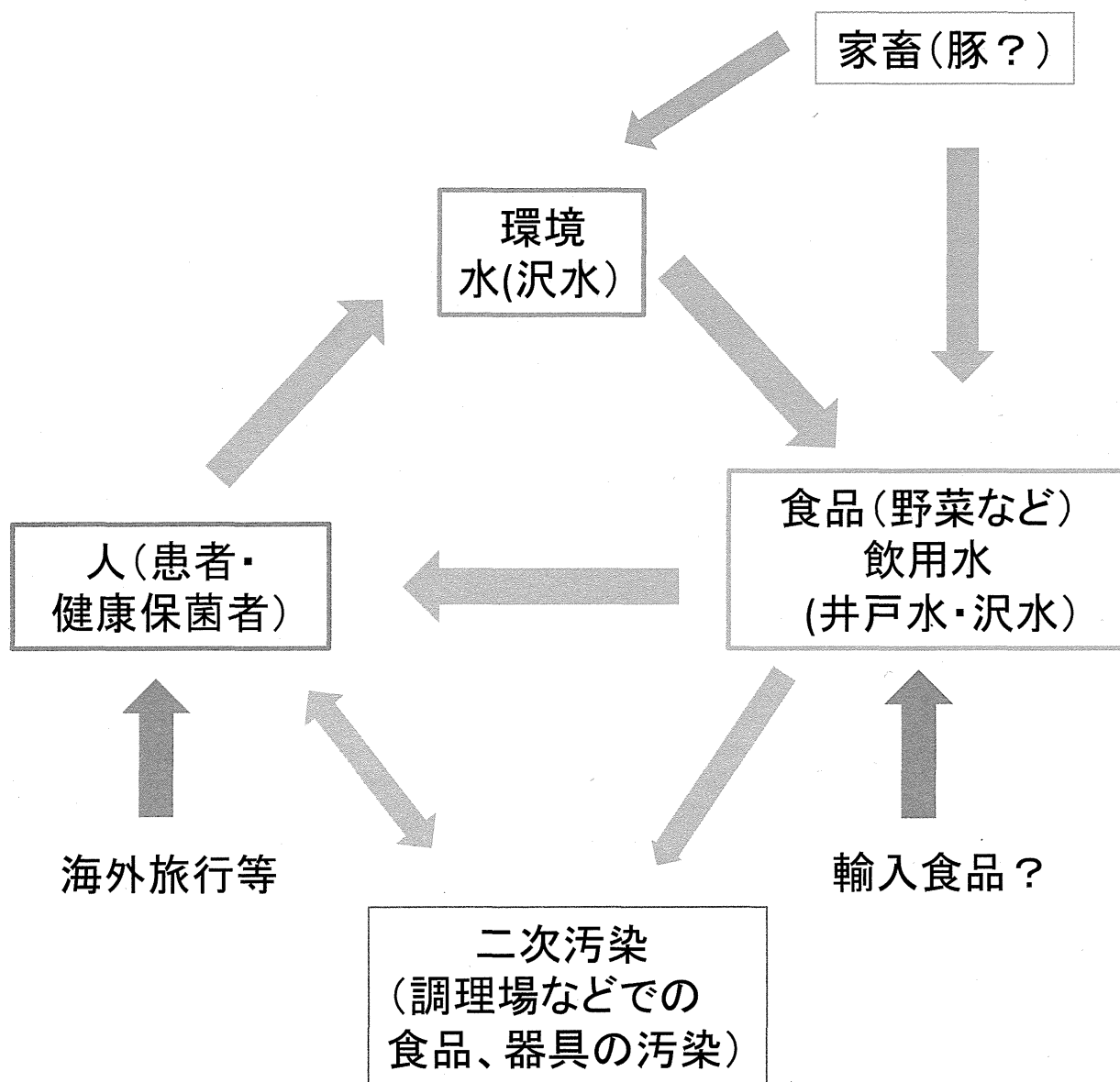


図1 国内で発生するETEC食中毒の原因(汚染経路)

Ⅱ. 分 担 研 究 報 告 書

分 担 研 究 報 告 書

食中毒・感染症事例由来株の 特性解析

小西 典子

平成 27 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）

食品での新たな病原大腸菌のリスク管理に関する研究

研究者代表者 工藤由起子 国立医薬品食品衛生研究所

分担研究報告書

食中毒・感染症事例由来株の特性解析

研究分担者 東京都健康安全研究センター 小西 典子

研究協力者 東京都健康安全研究センター 甲斐 明美

東京都健康安全研究センター 尾畑 浩魅

東京都健康安全研究センター 平井 昭彦

研究要旨

東京都で発生した毒素原性大腸菌（ETEC）による集団下痢症発生状況を年代別にみると 1991 年～2000 年の 10 年間は非常に多く発生しているが、2001 年以降はやや減少傾向であった。集団および散発下痢症事例から検出された ETEC の血清群を調べた結果、いずれも 06, 025, 027, 0148, 0159, 0169 が多く検出されていることが明らかとなった。食品を対象とした検査法を確立するためには、まずはこの 6 血清群を対象とするのが妥当であろうと考えられた。分離株の毒素型をみると、LT・ST 両毒素産生株、LT 単独および ST 単独産生株の 3 種類の毒素型が確認された。全体的には LT 産生株よりも ST 産生株の方が多かった。散発下痢症患者の多くは発症前に海外渡航が認められた。国内感染が明らかであったのは、77 株中 3 株（3.9%）のみであった。渡航先で多かったのはインド、インドネシア、中国等であった。実際の食品から ETEC を検出する方法は、培養液から毒素遺伝子でスクリーニング試験を行い、遺伝子検査で陽性となった検体から菌の分離を試みる方法が、非常に効率的であることが確認された。今後、増菌培地の種類や培養温度について詳細に検討する必要がある。またこれまでに ETEC を検出した原因食品をみると、野菜を使用した食品が多いことが明らかとなった。

A. 研究目的

ヒトに下痢症を引き起こす大腸菌は、主に病原血清型大腸菌（EPEC）、腸管出血性大腸菌（EHEC）、毒素原性大腸菌（ETEC）、組織侵入性大腸菌（EIEC）、腸管凝集付着性大腸菌（EAggEC）、その他の下痢原性大腸菌に分類されている。このうち ETEC による食中毒は、全国で毎年数事例発生し、

患者数が 500 名を超える大規模事例も報告されている。これら食中毒の感染源・原因食品を解明するためには、食品から ETEC を検出することが必要である。しかし食品には ETEC 以外の大腸菌や他の種類の細菌が付着している場合が多く、また ETEC が付着していたとしても非常に少量であるため、その検出は非常に困難であ

る。そのため食品から ETEC を効率的に検出可能な検査法の確立が急務となっている。そこで、食品を対象とした ETEC 検査法の確立のための基礎資料とするために、これまでに東京都で発生した ETEC による集団下痢症・食中毒の発生状況と原因食品および原因菌の特徴についてまとめた。また、散発下痢症患者から分離された ETEC の特徴について解析を行った。更に、実際の食中毒事例から ETEC が検出された事例について詳細に解析を行った。

B. 研究方法

1. 東京都における ETEC による集団下痢症の発生状況および分離株の特徴

1966 年から 2014 年に東京都で発生した ETEC による集団下痢症事例 133 事例を対象とした。今回対象とした事例は、患者 2 名以上から同一血清型・毒素型の ETEC を検出した事例であり、食中毒と決定されていない事例も含んでいる。各事例で分離された ETEC の血清型および産生する毒素型を調べまとめた。

2. 散発下痢症患者から分離された ETEC の特徴

1) 供試菌株

2012 年から 2014 年までに東京都立病院および公社病院で分離され、東京都健康安全研究センターで毒素検査を実施した大腸菌 1,063 株 (2012 年: 367 株, 2013 年: 360 株, 2014 年: 336 株) を供試した。

2) LT の検出

供試菌株をリンコマイシン加 CAYE 培地に接種し、37℃、18~20 時間振とう培養した。培養液 1ml に 20,000 単位のポリミキシン液を 0.1ml 添加し 37℃で 1 時間培養後、12,000 rpm で遠心分離を行った。

遠心上清を試料とし、市販のラテックス試薬 (VTE-RPLA, デンカ生研) を用いて LT の検出を行った。ラテックス凝集反応で陽性となった検体については、West ら (Veterinary Microbiol. 122, 323-332, 2007) のプライマーを用いた real-time PCR 法で LT 遺伝子の検出も行った。

3) ST の検出

供試菌株を CAYE 培地に接種し 37℃、18~20 時間振とう培養した。培養液 1ml に 20,000 単位のポリミキシン液を 0.1ml 添加し 37℃で 1 時間培養後、12,000 rpm で遠心分離を行った。遠心上清を試料とし、ELISA 法 (コリスト EIA, デンカ生研) で ST の検出を行った。ELISA 法で陽性となった検体については、real-time PCR 法を用いて、STh は著者らの方法 (未発表)、STp は West ら (Veterinary Microbiol. 122, 323-332, 2007) の方法で各遺伝子の検出を行った。

4) ETEC の血清型別試験

散発患者から検出された ETEC について市販の免疫血清 (病原大腸菌免疫血清「生研」, デンカ生研) を用いた O 群の血清型別試験および H 型別試験を実施した。

3. ネギを原因とした ETEC 食中毒事例の概要と食品を対象とした ETEC の検出

2011 年 9 月に東京都を中心とした 7 自治体で ETEC O148 : H28 (ST 産生) を原因とする食中毒が発生した。この事例では、収去した食品から ETEC の検出を試み、複数検体から O148 を検出することができた。この事例の概要と食品を対象とした検査について詳細に解析する。

C. 研究結果

1. 東京都における ETEC による集団下痢

症の発生状況および分離菌株の特徴

1) 年代別発生状況

EPECによる集団下痢症発生状況を年代別にみると1966～1970年の5年間には5事例、71年～80年の10年間には26事例、81年～90年は30事例、91年～2000年は42事例、2001年～2010年は29事例、2011年～2014年の4年間には1事例であった(表1)。1991年～2000年の10年間には非常に多く発生しているが、2001年以降はやや減少傾向であった。

2) 集団下痢症事例由来 EPEC の血清型と毒素型

133事例由来161株の血清群は14種類に分類された。最も多かったのは06で37株、次いで0169が32株、027が25株、0148が18株、025が14株、0159が13株であった。その他011、015、017、020、070、078、085、OUT(血清型不能)であった。06、025、027、0148、0159、および0169の6血清群で全体の86.3%を占めていた。主な6血清群の毒素産生性をみると、06はLT+ST両毒素産生株であったが、027、0148、0159、0169はST単独産生、025はLT単独産生株とST単独産生株の両タイプがあった(表2)。

2. 散発下痢症患者から分離された EPEC の特徴

1) EPEC 検出率

2012年から2014年に搬入された散発下痢症由来大腸菌1,063株について、LTおよびST産生性を調べた。その結果、77株(7.2%)がLT、STのいずれか一方あるいは両毒素産生菌であった。

2) 分離された EPEC の血清群と毒素型

散発下痢症患者から分離されたEPECの血清群で最も多く分離されたのは06で

14株(18.2%)、次いで025が12株(12.6%)、027、0159が各9株(11.7%)、0169が8株(10.4%)、0148が7株(9.1%)、0128が3株、015、0167が各2株、01、08、020、091、0114、0115、0153が各1株、血清型別不能(OUT)が4株であった(表3)。

ST単独産生株は54株、LT・ST両毒素産生株は13株、LT産生株は10株であった。

3. ネギを原因とした EPEC 食中毒事例

1) 事例概要

2011年9月上旬、複数の自治体で給食施設を原因とする食中毒が発生した。これらは同一の給食事業者が運営する給食施設で提供された給食が原因であった。当初、東京都内に患者は認められなかった。しかしこの給食事業者は、東京都内の複数の事業所で給食を提供し、セントラルキッチン方式で食材を各事業所へ提供していたため共通に使用されている食材が複数あること等が判明し、検食として保管してあった食品の検査を実施した。その結果、食品(ネギ)からEPEC 0148が検出された。そのため改めて喫食者の聞き取り調査が行われた結果、都内にも患者が確認された。最終的に都内3事業所の社員食堂で504名以上が喫食し、患者は62名となった。

2) 食品を対象とした EPEC 0148 の検査法

食品からの0148検出方法を図に示した。保存されていた食品が非常に少ない検体もあったことから、検体量に応じて10～15gをサンプリングした。サンプリング後、希釈液を等量加え2倍乳剤を作製し、試料とした。直接分離培養に用いた培地は、DHL寒天、CT-SMAC寒天、XM-G寒天である。増菌培養は、mEC培地を用い37℃18時間培養した。培養液からDNA抽出を行い、

リアルタイムPCR法でST遺伝子のスクリーニングを行った。そして遺伝子陽性検体からETECの分離を試みた。0148以外の大腸菌や、その他の細菌が多い検体については、mEC培養液から更にmEC培地に接種（二次増菌培養）し、42℃で18時間培養後に分離平板へ塗抹したものから釣菌を行った。また、0148を効果的に集菌するために0148に対する免疫磁気ビーズを自家調製し用いた。

3) ETEC 0148 が検出された食品

合計12検体からETEC 0148（ST産生）が検出された。これらの検体は5事業所から収去した食品で、洗浄前の原材料や検食であった。内訳は、ネギ、カットネギ、カットキャベツ、鱈のからあげ、冷奴（ネギ）等で、ネギそのものあるいはネギが使用された食品であった（表4）。

4) 食品中のETEC 0148の菌数

検体量が十分に残されていた検体を用いて食品中の0148菌数の測定を試みた。供試した3検体の0148菌数は、いずれも1gあたり0.3個以下で非常に少量であった。

4. 過去に発生した集団下痢症事例で食品からETECが検出された事例

食中毒の原因菌が、残されていた食品から検出される事例は非常に少ない。しかし東京都では、これまでに発生した食中毒事例5事例5食品からETECを検出している。その食品と原因血清型を表5にまとめた。

食品は野菜を使用しているものが4事例、1事例は杏仁豆腐であった。検出したETECの血清型は0169:H41が3検体、0148:H28が2検体であった。

D. 考察

1966年から2014年に東京都で発生したETECによる集団下痢症事例133事例について、血清型および毒素型の特徴についてまとめた。133事例由来161株の血清群をみると06、025、027、0148、0159、0169の6血清群で全体の86.2%を占めていた。また、2012年から2014年に分離された散発患者由来77株の血清群をみても、集団事例由来株と同様の6血清群で76.6%を占めていた。食品を対象とした検査法を確立するためには、まず対象とする血清群を決めることが必要である。集団および散発事例由来株のいずれも06、025、027、0148、0159、0169が多く検出されていることが明らかとなったことから、まずは上位6血清群を対象とするのが妥当であると考えられた。

分離株の毒素型をみると、06はLT・ST両毒素産生株、LT単独およびST単独産生株の3種類の毒素型が確認された。また025はLT単独あるいはST単独と、どちらか一方の毒素を産生する株が多いことが明らかとなった。全体的にはLT単独産生株よりもST単独産生株の方が多かった。

散発患者の多くは下痢の発症前に海外渡航が認められ、国内感染が明らかであったのは、77株中3株（3.9%）のみであった。渡航先で多かったのはインド、インドネシア、中国等であった。これらの国では水や食品、環境中にETECが多く存在することが推定されるため、生水や加熱されていない食品の接種には注意が必要である。また、これらの地域から輸入される食品も、本菌に汚染されている可能性が考えられる。

東京都で発生した食中毒事例のうち、

2011 年に発生した給食施設を原因とした事例では、複数の食品（カットネギ等）から原因菌を検出することができた。腸管出血性大腸菌の検査法を参考に、増菌培養は mEC で行い、培養液から ST 毒素遺伝子を PCR 法でスクリーニングする方法で実施した。ST 遺伝子陽性検体から 0148 の分離を試みたが、mEC 培養液中には 0148 以外の大腸菌やその他の細菌が非常に多く、分離が困難であった。そこで mEC 培地から更に mEC 培地へ接種し、培養温度を 42℃ に上げることで、他の菌の発育を抑えることが可能であった。二次（二段階）増菌培養でも分離が困難であった検体については、自家調製した免疫磁気ビーズを用いて集菌することで、検出が可能となった。今後は、適切な増菌培地や培養温度についても検討する必要があると考えられた。

1993 年以降に東京都で発生した ETEC 食中毒事例のうち、食品から原因食品が検出できた事例は本事例を含めて 5 事例であった。その内訳をみると、「ほうれん草のピーナツあえ」「野菜のあえもの」や「キムチ」等であった。腸管出血性大腸菌食中毒の原因食品の多くは、牛肉を中心とした肉類であるが、ETEC は野菜を使用した食品が原因となることが多いことが明らかとなった。

E. 結論

集団および散発下痢症事例から検出された ETEC の血清群を調べた結果、いずれも 06, 025, 027, 0148, 0159, 0169 が多く検出されていることが明らかとなった。食品を対象とした検査法を確立するためには、まずはこの 6 血清群を対象とする

のが妥当であろうと考えられた。

分離株の毒素型をみると、LT・ST 両毒素産生株、LT 単独および ST 単独産生株の 3 種類の毒素型が確認されたが、全体的には ST 単独産生株が多かった。

散発下痢症患者の多くは、発症前に海外渡航が認められた。国内感染が明らかであったのは、77 株中 3 株（3.9%）のみであった。渡航先で多かったのはインド、インドネシア、中国等であった。

実際の食品から ETEC を検出する方法は、培養液から毒素遺伝子でスクリーニング試験を行い、遺伝子検査で陽性となった検体から菌の分離を試みる方法が、非常に効率的であることが確認された。今後、増菌培地の種類や培養温度について詳細に検討する必要がある。

これまでに ETEC を検出した原因食品をみると、野菜を使用した食品が多いことが明らかとなった。

F. 健康危機情報

ETEC が検出された散発下痢症患者の渡航歴を遡り調査すると、東南アジア地域への旅行が多かった。これらの地域へ旅行をする際は、生水や加熱していない食品の摂取に注意すべきである。

G. 研究発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし