

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）
「我が国で優先すべき生物学的ハザードの特定と管理措置に関する研究」
平成 28 年度分担研究報告書

サルモネラ、赤痢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

病原体に汚染された食品等を介して発生する細菌感染症にはサルモネラ症、赤痢、コレラなどがある。これらは国内外でさまざまな汚染ルートを介し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している。昨年度に引き続き、赤痢菌、とくに *Shigella sonnei* の分子疫学解析を重点的に進めた。本菌は multilocus variable-number tandem-repeat analysis (MLVA) による解析が有用であることが本研究で示された。輸入例および国内例関連株のデータ収集および蓄積を行った。これまでに延べ約 1,300 株のデータを収集した。輸入例関連株に関し、10 か所の遺伝子座を用いた *S. sonnei* の MLVA 法から 3 つの大まかなグループに大別することができ、これはゲノム解析から報告されている系統と相関することが示された。*S. sonnei* は SM、TC、STX への耐性率が高かった。国内例株の CTX、CPFX、GM に対する耐性は、その年の流行に左右された。輸入例の薬剤耐性は渡航先によっても偏りがあることが示唆された。本研究は、病原体の継続的な分子疫学解析並びにデータの蓄積が海外から侵入してくるハザードへの対応に欠かせないことを示唆している。

A. 研究目的

食品および食材、ならびに人の流れがグローバル化してきている中で、食品の生物学的ハザードについても多様化、複雑化が見られる。食品における生物学的ハザードについては主に食中毒という形で我々の前に出現するが、その発生原因及び態様はさまざまである。細菌などの微生物によるハザードは、食品流通・加工ならびに原因物質などの多様性・複雑性から多岐にわたり、その要因の特定を困難なものにしている。本研究では、国内外の生物学的ハザードに関して情報収集および原因物質の解析を行い、ハザードの特定に有用な情報もしくは解析法の検討を行う。さらに、ハザード発生時に必要な管理措置につながる対応への一助とすることを目的とする。

食品衛生法における細菌性食中毒の原因物質

として現在 15 種類ほどの菌種が挙げられている。本年度は海外からの侵入リスクが高いと考えられる赤痢菌をモデル対象として研究した。

赤痢菌は細菌性赤痢の起因菌であり、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、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いる。当該国ではサーベイランス体制が不十分なため細菌性赤痢の発生状況を知ることは極めて困難である。従って、菌株解析を通じて輸入例と国内例の対比を行うことは

本感染症への対策を検討するに当たり重要な工程と考えられる。本研究では、国内外の細菌性赤痢の発生状況に関する情報収集、ならびに国内外の分離菌株に関する分子疫学的解析手法の検討及びデータベースの構築を行うことを主たる目的とする。

B. 研究方法

国内事例については感染症発生動向調査、食中毒発生状況などを、海外事例については論文雑誌・米国 CDC、欧州 CDC からの資料などを参考に情報収集を行った。

分離菌株の解析については、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。系統を大別する SNP 検索には SNaPshot による方法を開発、使用した。薬剤感受性試験はディスク法を用いて実施した。

C. 研究結果および考察

感染症発生動向調査では、2015 年の細菌性赤痢の発生数は 156 であった (図 1)。2012-2015 年の推定感染地域は約 3 割が東南アジアからの輸入例、2 割が南アジアからの輸入例、3 割が国内例であった (図 2)。

赤痢菌には *S. dysenteriae*、*S. flexneri*、*S. boydii*、*S. sonnei* の 4 菌種があるが、検出頻度は *S. flexneri* が 22%、*S. sonnei* が 75% と大勢を占めていた。

米国において、2014 年の赤痢菌による食中毒患者数はサルモネラ、カンピロバクターに次いで 2,774 名であり、死亡率も 0.1% と決して低くない (表 1)。

2016 年に当部に送付され、解析された *Shigella*

sonnei は 55 株であった。うち、輸入例は 38 株で、主な渡航先は東南アジア 19 株、南アジア 6 株、東アジア、アフリカが各 4 株であった。これらについて、MLVA による解析を行った。上記輸入例はそれぞれ、これまでに収集したデータベース上にて各地域に相応するグループに振り分けられた。

これまでに構築したデータベース内の *S. sonnei* 輸入例株について、MLVA 解析によるグルーピングとゲノム情報からの系統との関連性について検討した。系統の大別には SNaPshot を用いた。その結果、10 遺伝子座を用いて 3 遺伝子違いを基準にコンプレックを形成させて得られる (MLVA10) と、大きく 3 つのグループについて、南アジア関連株が大勢を占める中央のグループ (a) は系統 IIIb、東南アジア由来が大勢を占める小さなグループ (b) は系統 II、残りのグループ (c) は系統 IIIc がほとんどであり、MLVA の結果が地域性以外に、系統も反映していることが示唆された (図 3)。

2011-2015 年の *S. sonnei* について薬剤耐性の傾向を整理した。*S. sonnei* は全体に薬剤耐性率が高く、ストレプトマイシン (SM)、テトラサイクリン (TC)、ST 合剤 (STX) の耐性率はいずれも 7 割を超え、同 3 剤耐性菌の割合は 6 割以上であった (図 4)。

耐性を注視すべき薬剤として、キノロン、セフェム系抗菌薬があるが、ナリジクス酸 (NA) 耐性が 5 割、シプロフロキサシン (CPFEX) 耐性が 2 割、セフォタキシム (CTX) 耐性が 2 割弱であった。CPFEX+CTX 耐性は 1% 以下であった。また、ゲンタマイシン耐性が 2 割弱検出された (図 5)。

NA、CPFEX、CTX、ゲンタマイシン (GM) 耐性について、1) 輸入例の地域別 (表 2)、2) 及び国内例の年別 (表 3) について整理した。NA 耐性は南アジア、東アジアで高く、CPFEX 耐性は南アジアで高かった。1) CTX 耐性は西アジアで高かったが、これは 2012 年に発生したトルコツアーによる事例に関する株であった。GM 耐性は

東アジア、西アジアで高かった。2) CPMX は 2015 年に、効率に検出された。CTX および GM 耐性は 2011 年に多く検出された。前者は広域散発例の発生によって、後者は飲食医チェーン店の食中毒事例の発生によって検出率が高くなったものであった。

S. sonnei のサーベイランスにおいて、MLVA の活用によって輸入例をグループ化できることが明らかとなってきた。また、当該グループが地域性および遺伝学的な系統を反映していることが示唆された。薬剤耐性の傾向は輸入例の地域により異なり、国内例ではその年の流行株によって変化することが示された。MLVA などの遺伝学的解析および薬剤耐性の傾向から国内例と輸入例との関連性がより詳細にわかることが示唆された。

今後も引き続きサーベイランスを継続することでデータベースの厚みを増し、データの信頼性を高めていく必要があると考えられる。

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。今後も海外の発生状況の情報収集が必要である。また、国内の監視体制の整備のため、分離菌株の解析手法の検討ならびに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

Nguyen DT, Ngo TC, Le TH, Nguyen HT, Morita M, Arakawa E, Ohnishi M, Nguyen BM, Izumiya H. Molecular epidemiology of *Vibrio cholerae* O1 in northern Vietnam (2007-2009), using multilocus

variable-number tandem repeat analysis. J Med Microbiol. 2016 Sep;65(9):1007-12.

泉谷秀昌、森田昌知、大西真： *Shigella sonnei* における分子疫学解析および薬剤耐性について。第 90 回日本感染症学会総会、2016 年 4 月、宮城県仙台市。

泉谷秀昌：分子疫学解析を用いた赤痢菌のサーベイランスについて。第 37 回日本食品微生物学会学術総会、2016 年 9 月、東京都。

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 . 米国食品由来感染症発生状況 (2014 年)

起因菌	患者数	対10万人	入院数	入院率	死亡数	死亡率
カンピロバクター	6465	13.29	1088	15	9	0.1
リステリア	116	0.24	106	91	17	15
サルモネラ	7439	15.29	2144	29	32	0.4
赤痢菌	2774	5.70	575	21	4	0.1
STEC O157	444	0.91	155	35	3	0.7
STEC non-O157	697	1.43	106	15	2	0.3
ビルリオ属菌	221	0.45	44	20	3	1
エルシニア	136	0.28	30	22	1	1

表 2 . *S. sonnei* 輸入例株に関する薬剤耐性と推定感染地域 (2011-2015 年)

地域	東南亜	南亜	東亜	西亜	アフリカ	その他
NA (%)	49.4	100.0	94.1	0.0	0.0	55.0
CPFX (%)	14.8	95.8	0.0	0.0	0.0	25.0
CTX (%)	8.6	4.2	11.8	100.0	0.0	15.0
GM (%)	0.0	0.0	88.2	100.0	0.0	0.0
<i>n</i>	81	72	17	12	11	20

表 3 . *S. sonnei* 国内例株に関する薬剤耐性の推移

年	<i>n</i>	NA (%)	CPFX (%)	CTX (%)	GM (%)
2011	122	54.1	1.6	36.9	41.8
2012	43	14.0	4.7	4.7	2.3
2013	16	12.5	6.3	6.3	0.0
2014	26	11.5	7.7	0.0	0.0
2015	40	62.5	42.5	0.0	0.0

図1．細菌性赤痢：発生動向（NESID、2008-2015年）

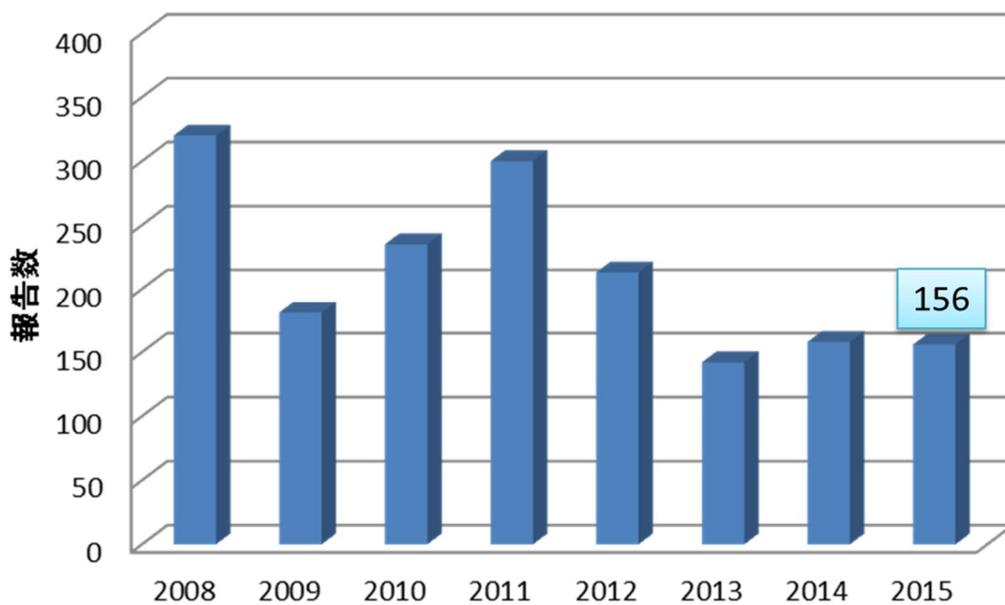


図2．細菌性赤痢：推定感染地域別分布（NESID、2012-2015年）

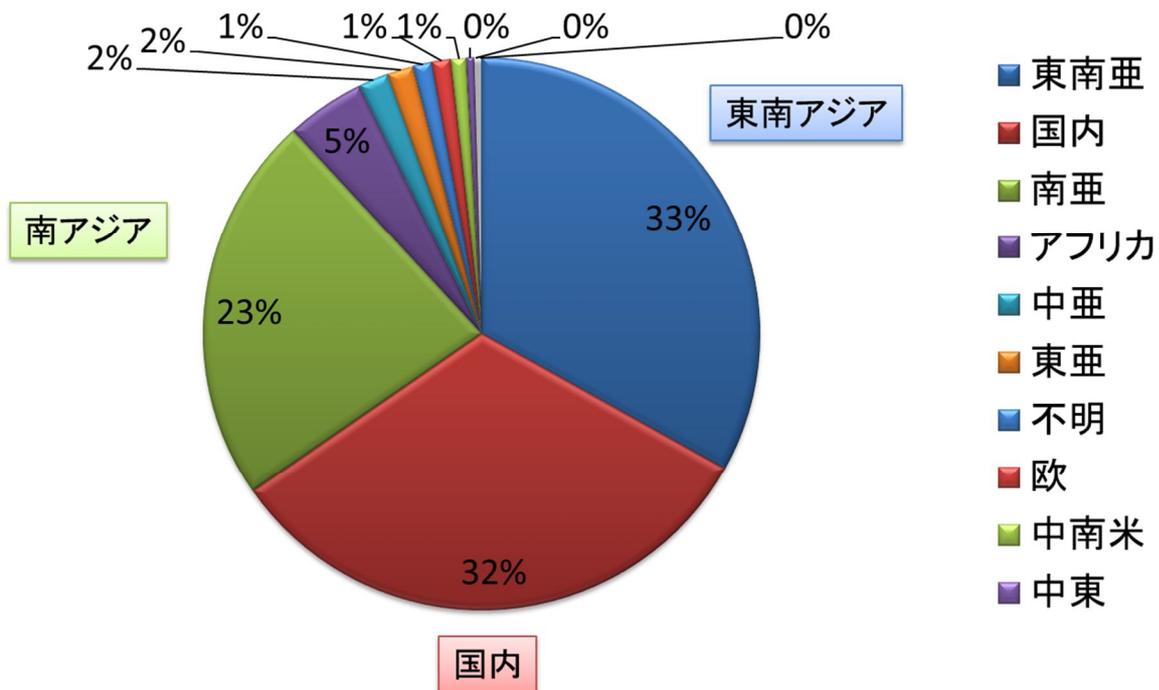


図 3 . *S. sonnei* MLVA10 解析。3 遺伝子違い (3 locus-variant) によるグループ化 (a, b, c) と系統解析 (II, IIIb, IIIc) 解析した株について色分けしてある。白い部分は未解析の株を示す。

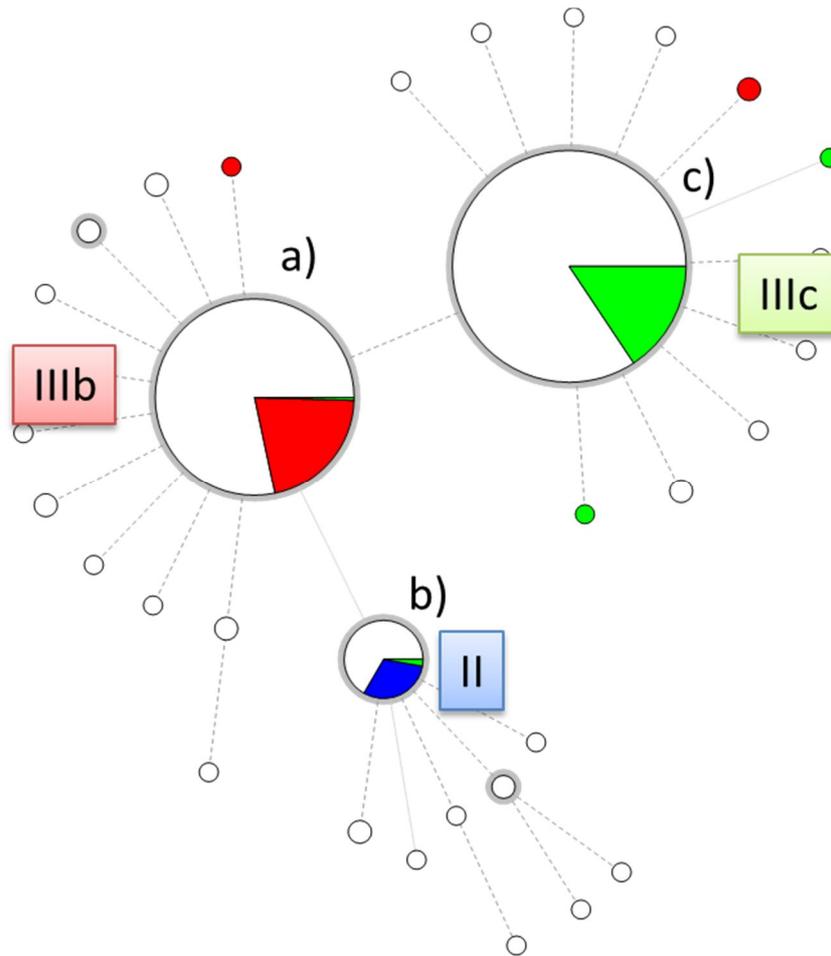


图 4 . *S. sonnei* 藥劑耐性分布 1 (2011-2015 年)

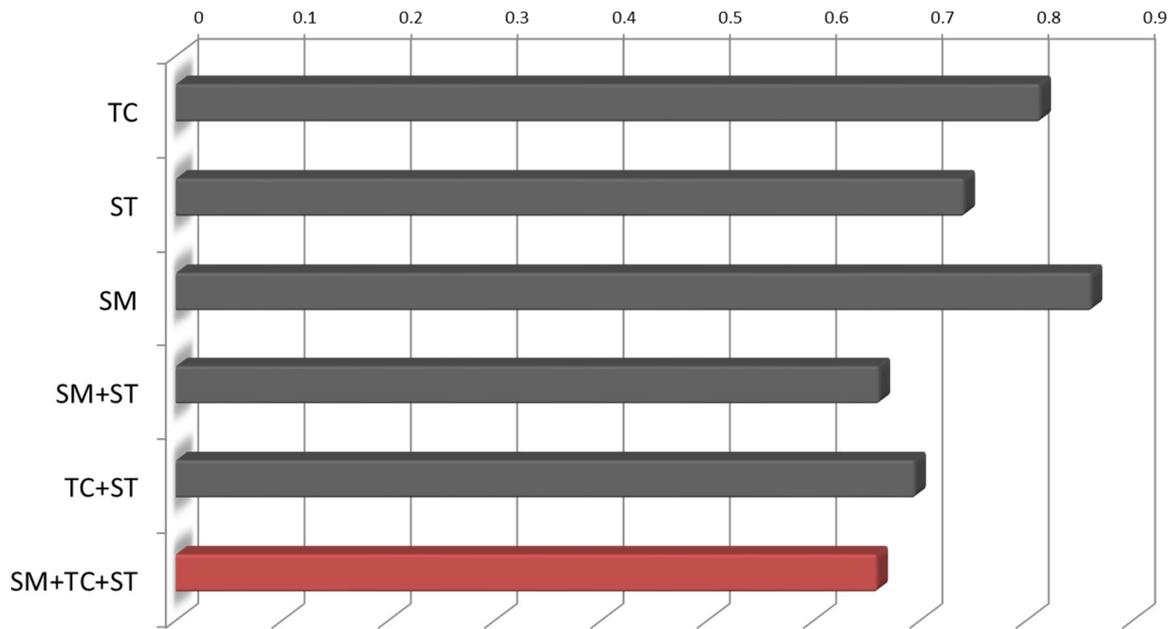


图 5 . *S. sonnei* 藥劑耐性分布 2 (2011-2015 年)

