

厚生労働科学研究費補助金(新興・再興感染症及び予防接種政策推進研究事業)
「国内の病原体サーベイランスに資する機能的なラボネットワークの強化に関する研究」班

分担研究報告書

大腸菌・レジオネラ

研究分担者	前川 純子	国立感染症研究所 細菌第一部
研究協力者	伊豫田 淳 森本 洋 千田 恭子 大屋 日登美 磯部 順子 田中 忍 平塚 貴大 吉野 修司 川口 定男	国立感染症研究所 細菌第一部 北海道立衛生研究所 仙台市衛生研究所 神奈川県衛生研究所 富山県衛生研究所 神戸市環境保健研究所 広島県立総合技術研究所 宮崎県衛生環境研究所 板橋区保健所

研究要旨 大腸菌、レジオネラ属菌の機能的なラボネットワークの構築・改善点を抽出することを目的とした。精度の高いサーベイランスを全国的に実施するためにも、技術的基盤の継承が重要である。平成29年度においては、大腸菌レファレンスセンターでは、検査に必要なコントロール株およびDNAの配付を行い、レジオネラ・レファレンスセンターでは免疫血清の配布を行なった。また、現在実施されている病原体サーベイランスの状況を検証した。多施設における検査の品質保証を的確に行なうことは必ずしも容易ではない。今後も、問題点の把握とそれを解決するための方法を検討していく。

A. 研究目的

大腸菌

ヒトに下痢を発症させる下痢原性大腸菌は保有する病原性遺伝子ごとにいくつかのカテゴリーに分類される。このうち、日本国内で死亡者を含む重症例の原因となっているのが腸管出血性大腸菌 (*enterohemorrhagic E. coli*: EHEC) である。原因菌として半数以上を占めるのが O157 で、O26, O111, O103, O145, O121, O165 で重症例由来株のほとんどを占める(細菌第一部の集計による)。EHEC 以外の下痢原性大腸菌カテゴリーについては EHEC と比較して重症例は少ないが、EHEC とのハイブリッドタイプとして検出されるいくつかのカテゴリー(腸管病原性大腸菌 [*enteropathogenic E. coli*: EPEC]、腸管凝集接着性大腸菌 [*enteroaggregative E. coli*:

EAggEC]) を含む、各病原性遺伝子の検出が重要である。EHEC を中心とした下痢原性大腸菌の血清型解析結果に基づいた病原性遺伝子検出法、血清診断法、および菌分離法について検査マニュアル化すると共に、それらの検査に必要なコントロール株等の配布・精度管理を行う。

レジオネラ

感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律第15条第1項の規定の実施のための法律施行規則第8条第2項に基づき、レジオネラ感染症の発生状況、動向及び原因の調査のため、国立感染症研究所および地方衛生研究所で構築されるレジオネラ・レファレンスセンターにおいて、病原体サーベイランスとして、臨床分離株の収集と遺伝子型別を実施する。レジオネラ属菌検出法の確立と普及のため、

外部精度管理サーベイを実施するための体制作りの支援をする。*L. pneumophila*の血清群別をより簡便に行えるよう市販されていない混合血清を作製し、レファレンスセンターを通じて全国の地衛研に配布する。また、自治体における環境水からのレジオネラ検査の状況を明らかにする。

B. 研究方法

1. 大腸菌血清型別・遺伝子型別

デンマーク血清学研究所 (Staten Serum Institut: SSI)あるいはデンカ生研から購入した血清を用いて実施した。PCR法はIguchiらの方法 (J Clin Microbiol. 53(8): 2427-32. 2015; 未発表データ)に従って実施した。

2. レジオネラ SBT 法

L. pneumophila については、EWGLI (European Working Group of *Legionella* Infections) の提唱する SBT (sequence-based typing)法に従い、*flaA*、*pilE*、*asd*、*mip*、*mompS*、*proA*、*neuA* 遺伝子の一部領域の塩基配列を決定し、遺伝子型別を行った。

(http://www.hpa-bioinformatics.org.uk/legionella/legionella_sbt/php/sbt_homepage.php)

C. 研究結果

1.1 EHEC のサーベイランス

2017年に細菌第一部で受け付けたヒト由来のEHECは全3,362株であり、その分布は、血清群 O157 (55.2%)、O26 (24.8%)、O103 (4.8%)、O111 (4.2%)、O121 (2.3%)、O145 (1.6%)、O91 (1.2%)、O165 (0.3%)、その他 (5.6%)であった。

1.2 コントロール株の配布

下痢原性大腸菌の各カテゴリー (EHEC,

EPEC, EAggEC, ETEC [enterotoxigenic *E. coli*: 腸管毒素原性大腸菌], EIEC [lenteoinvasive *E. coli*: 腸管細胞侵入性大腸菌])のコントロール株、EHECのマーカである志賀毒素遺伝子のサブタイプ検出用コントロール株(またはDNA)の配布を次の各衛生研究所または保健所等: 福井県衛生環境研究センター、豊田市衛生試験所、神戸市環境保健研究所、青森県環境保健センター、越谷市保健所、船橋市保健所へ行った。配布を行ったいくつかの地研からは、解析に関するトラブルシューティング、および解析結果に関する問い合わせを受け付けた。

1.3 O-/H-genotyping PCR 法の大腸菌サーベイランスへの導入

共同研究として他の研究班で開発した大腸菌 O-/H-genotyping PCR 法(大腸菌の血清型 [O:H型]をPCRで決定できる手法)をEHECのサーベイランスに導入し、抗血清を用いた型別法との整合性を確認した。EHECの国内分離株の一部に抗血清による型別結果とOg/Hg型別結果が一致しない菌株が存在することが判明した。さらに、感染研・細菌第一部で受け付けた複数のHUS患者便検体から、マイナーなO群のEHECが分離されることが明らかとなった。

2.1 レジオネラ・レファレンスセンターにおける臨床分離株の収集状況

レジオネラ・レファレンスセンターにおいて、収集した臨床分離株の遺伝子型別の結果を、毎年、衛生微生物技術協議会研究会のレファレンスセンター関連会議で報告している。レジオネラ・レファレンスセンターにおいて、2007年8月よりレジオネラ臨床分離株の収集を行っている。昨年度の報告以降、76株が追加された(表1)。*Legionella pneumophila* 血清群 (SG)1が71株、SG2、5、9、10、および*Legionella longbeachae* SG2が各1株であ

った。入浴施設の散発事例で施設由来の菌株と PFGE が一致した例は 2 例あった。推定感染源については、およそ半数は感染源が不明で、入浴施設が感染源と推定されているのは 3 分の 1、残りの 6 分の 1 については土壌あるいは塵埃等が感染源であると推定されている。

2017 年 3 月末現在で、合計 528 株のレジオネラ属菌臨床分離株が収集できた(図 1)。*L. pneumophila* が 517 株(97.7%)で、そのなかでも *L. pneumophila* 血清群 1 が多く、全体の 87%を占めている(表 2)。

L. pneumophila については遺伝子型別を行っており、結果を随時返している。517 株は、ST1 から ST2387 まで 208 種類の遺伝子型に分けられた。遺伝子型と菌が生息する環境に関連性が見られており、遺伝子型別は感染源を推測する手がかりになると考えられる。

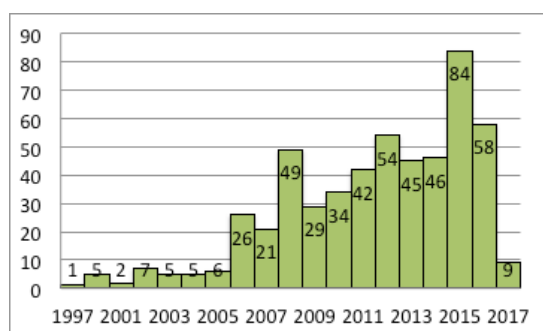


図 1 分離年別レジオネラ臨床分離株
(2017 年 3 月末日現在)

2.2 レジオネラ属菌外部精度管理サーベイの実施および市販されていない *L. pneumophila* 混合免疫血清の配付

レジオネラ属菌外部精度サーベイへの参加および、*L. pneumophila* 混合免疫血清の配付にあたり、レジオネラ・レファレンスセンターの各支部の担当が取りまとめ等を行なった。外部精度管理サーベイには、昨年度同様 71 地衛研が参加し、各地衛研で、送付されたサン

プル中のレジオネラ属菌の菌数を求めた。菌数は非濃縮検体と濃縮検体についてそれぞれ算出した。非濃縮検体については、93%の機関が良好範囲内の結果となった。ろ過濃縮法については、良好範囲機関が 75%、遠心濃縮法は良好範囲機関が 80%となり、昨年度同様多くの地衛研が良好範囲内となった。

2.3 地衛研および保健所におけるレジオネラ検査の実態調査

地衛研および保健所における環境水のレジオネラ検査の実態調査を行なった。環境水のレジオネラ検査は98%の地衛研で実施されていた。保健所におけるレジオネラ検査実施状況は自治体により異なっており、全体では481保健所中、104保健所で実施されていた。47都道府県設置保健所でみると、山形県、新潟県、富山県、高知県は全保健所で実施されており、10道府県は一部保健所で実施されていた。保健所設置市(74市)の保健所では、29市の29保健所で実施され、30市は地衛研で実施されていた。7市は検査を委託していた。8市は不明であった。東京23特別区においては、18区保健所で検査を実施していた(一部は地衛研での実施)。2区は委託で、検査担当なしの区が3区あった。

D. 考察

昨年度更新した「EHEC 検査マニュアル」の記載内容についてトラブルシューティング等を受け付けると共に、コントロール株(DNA)の配布等をさらに継続的に実施する必要がある。加えて、抗血清を用いた型別法と O/H-genotyping PCR 法との整合性解析をさらに詳細に実施する必要がある。

レジオネラ症は年間 1500 症例を越え、死亡例も少なくないが、多くの場合感染源は不明である。菌分離に取り組んでいる地衛研もあり、現在の菌分離は全症例の 5%程度となってい

る。分離菌の遺伝子型別の結果を地衛研から保健所、医療機関に還元することで、感染源の解明につながることを期待される。

今回の調査で、自治体における環境水のレジオネラ検査の実態が初めて明らかとなった。98%の地衛研で環境水のレジオネラ検査が行われており、地衛研の重要性が明らかとなった。また、自治体によりレジオネラ検査の実施状況に差があることが判明した。

環境水のレジオネラ検査は、レジオネラ症の感染源となりえる水系施設の衛生管理の状態の把握のために不可欠である。検査精度の担保のための外部精度管理に参加することで、検査精度の向上が認められるが、検査結果が良好範囲とならない地衛研も一部存在し、研修等の実施が必要と考えられた。

E. 結論

病原細菌の病原体サーベイランスのための機能的なラボネットワークの強化には、各施設において実施可能な手法の共有と、技術的継承が必要である。本研究の具体的実施項目を通じて各担当者間でのコミュニケーションが維持され、問題点、ニーズが明らかになることが期待できる。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

論文発表

1. 今野貴之、高橋志保、鈴木純恵、檜尾拓子、熊谷優子、木内 雄、石井 淳、前川純子、大西 真、倉 文明:2016年に多発傾向がみられたレジオネラ症の解析—秋田県. 病原微生物検出情報. 2017. 38(1):22.

学会発表

1. 中植 竜大、村井美代、前川純子. *Legionella pneumophila*の血清群別を目的とした塩基配列の解析. 第12回日本臨床検査学教育学会学術大会. 2017年8月、越谷.

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

