

. 総 合 研 究 分 担 研 究 報 告 書

総 合 研 究 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 ～ 29 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。

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

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

ETEC 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。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 ETEC 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。

2. 散発下痢症患者から分離された ETEC の特徴

1) ETEC 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 ETEC の血清群と毒素型

散発下痢症患者から分離された ETEC 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。

ST 単独産株は 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 ETEC 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 ETEC 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 ETEC 0148 の検査法

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、鯖のからあげ、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。

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 1 g 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。

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. 健康危険情報

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