

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 29 年度分担研究報告書

サルモネラ、赤痢菌、コレラ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

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、赤痢菌の分子疫学解析を重点的に進めた。mutiocus variable-number tandem repeat analysis (MLVA) を用いて、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 1,800 株のデータを収集した。*S. sonnei* 輸入例関連株の解析から示唆されていた 3 グループがそれぞれ系統 II、IIIb、IIIc に、さらに系統 I も併せて MLVA データと相関することが明らかとなった。*S. flexneri* に関する MLVA 法の改良を行い、異なる菌株をより明確に区別することが可能となった。検疫所からの輸入食品サルモネラ株の解析について検討を開始した。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。

MLVA データと系統との関連性については、統計解析ソフトウェア R を使用した。

C. 研究結果および考察

感染症発生動向調査では、2016 年の細菌性赤痢の発生数は 121 であった (図 1)。2012-2016 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 *Shigella dysenteriae*、*S. flexneri*、*S. boydii*、*S. sonnei* の 4 菌種があるが、2012-2016 年の検出頻度は *S. flexneri* が 27%、*S. sonnei* が 70% と大勢を占めていた。

米国において、2015 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 2,645 名であり、死亡率は 0.04% であった (表 1)。

2017 年に当部に送付され、解析された *S. sonnei* は 70 株であった。うち、輸入例は 41 株で、主な渡航先は東南アジア 21 株、南アジア 9 株、中央アジア、アフリカが各 3 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。ミャンマー及びカンボジア由来株は南アジア由来株が多くを占めるクラスターの近くに分布した。同じツアー事例由来株、陰性確認で陽性となった株はクラスターを形成した。このほか、国内例株においてもいくつかクラスターが観察された (図 3)。

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。系統を指標に、MLVA データを主成分判別分析にかけたところ、系統 I、II、IIIb、IIIc がそれぞれの

クラスターを明確に形成させることができた(図4)。使用している MLVA 遺伝子座の中で上記クラスターに寄与する 6 か所の遺伝子座に関するマトリクスを用いることで、系統 4 種を有意に判別可能であることが明らかとなった。2017 年株について、上記マトリクスを使用した系統推定を行い、MLVA-minimum spanning tree にあてはめると、MST 上で各系統に合わせて分布することが明らかとなった(図5)。

S. flexneri については MLVA および PFGE を併用している。MLVA の分解能を向上させるため、公共データベースにあるゲノム情報を解析し MLVA に使用する遺伝子座を 17 追加した。追加した結果、特に血清型 3a において顕著な改善が見られた。すなわち、1 遺伝子座違いの株同士が 3 遺伝子座以上異なるなどの変化がみられた(図6)。

輸入食品由来のサルモネラ株の解析を検討した。供試菌株は 1 株。血清型は Stanley であった。MLST による ST は 29 であった。同じ血清型のストック株を PFGE により比較したがパターンが一致したものはなかった。

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。特に MLVA データと系統とは相関があり、MLVA データから系統を推測することが可能であることが示唆された。

赤痢菌のような海外からの侵入が懸念される菌種、本年検疫所で分離されたサルモネラなど、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を構築し、様々な観点からデータを解析し、技術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、検疫所等の先生方に深謝いたします。

E. 研究発表

論文発表

泉谷秀昌、森田昌知、李謙一、大西真：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。日本食品微生物学会雑誌、第 34 巻第 2 号、90-95、2017 年

泉谷秀昌：赤痢総論。平成 29 年度国立保健医療科学院 細菌研修、2017 年 11 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（2015 年）

起因菌	感染者数	対10万人	入院数	入院率	死亡数	死亡率
カンピロバクター	6289	12.82	1087	17.3	13	0.21
リステリア	116	0.24	111	95.7	15	12.93
サルモネラ	7719	15.74	2104	27.3	32	0.41
赤痢菌	2645	5.39	626	23.7	1	0.04
STEC O1157	465	0.95	179	38.5	3	0.65
STEC non-O157	807	1.65	125	15.5	1	0.12
ビルリオ属菌	195	0.40	48	24.6	5	2.56
エルシニア	139	0.28	38	27.3	1	0.72

図 1. 細菌性赤痢：発生動向（NESID、1999-2016 年）

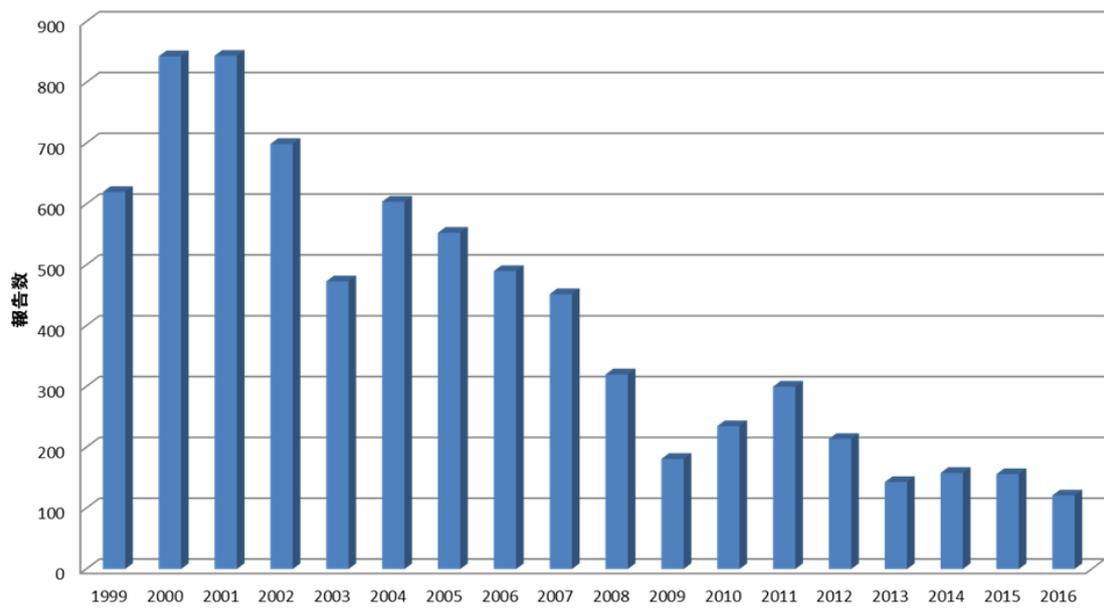


図 2. 細菌性赤痢：推定感染地域別分布（NESID、2012-2016 年）

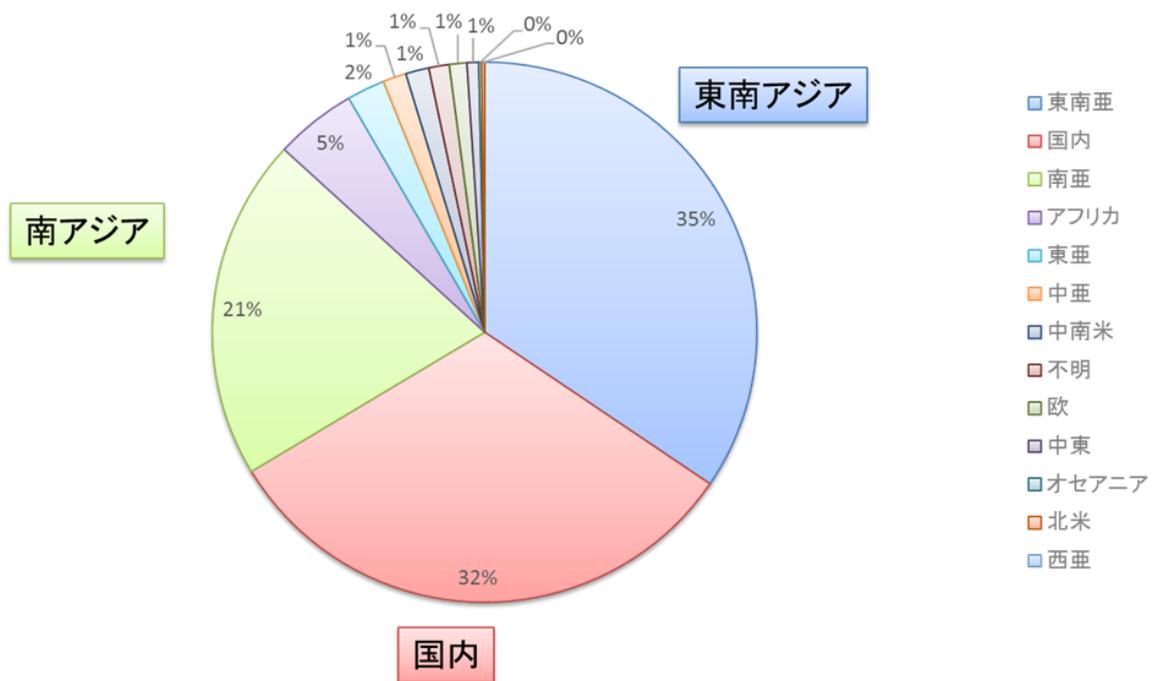


図 3. 2017年 *S. sonnei* MLVA 解析。色つきは輸入例株を表す（緑、東南アジア；赤、南アジア；黄、アフリカなど）。色なしは国内例もしくは不明株を表す。

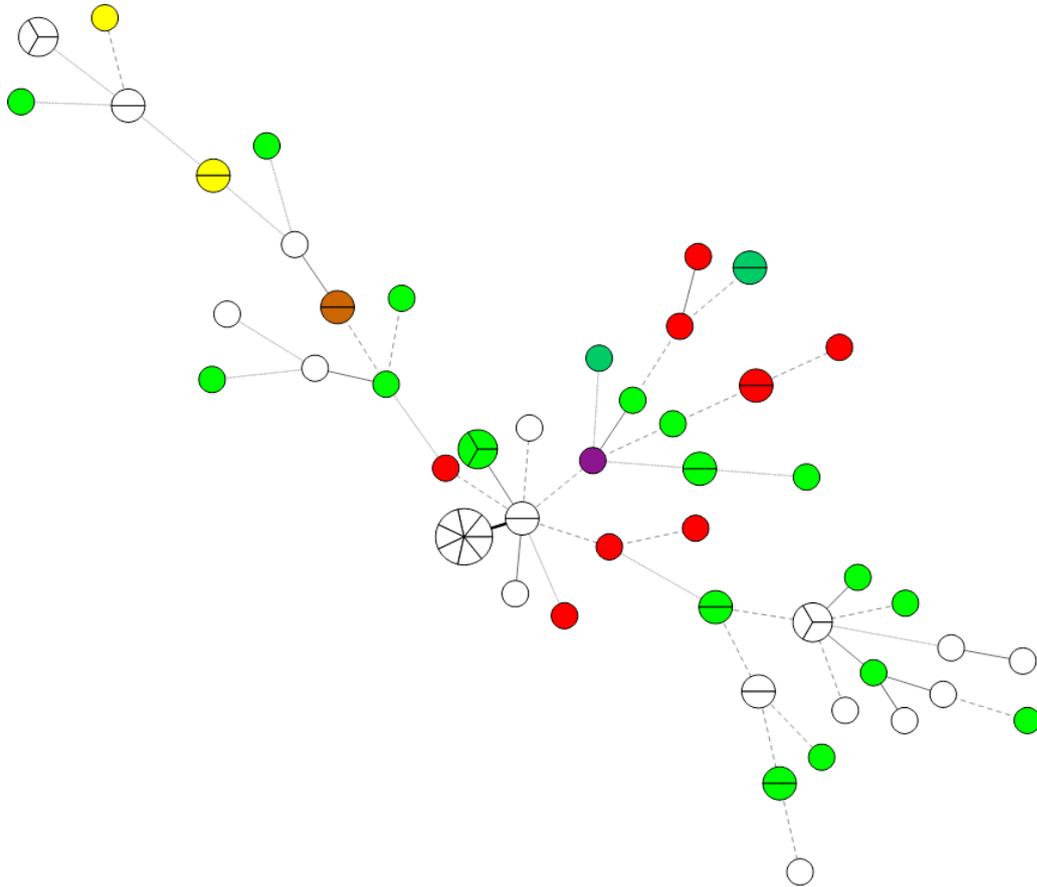


図 4. *S. sonnei* MLVA データ主成分判別分析

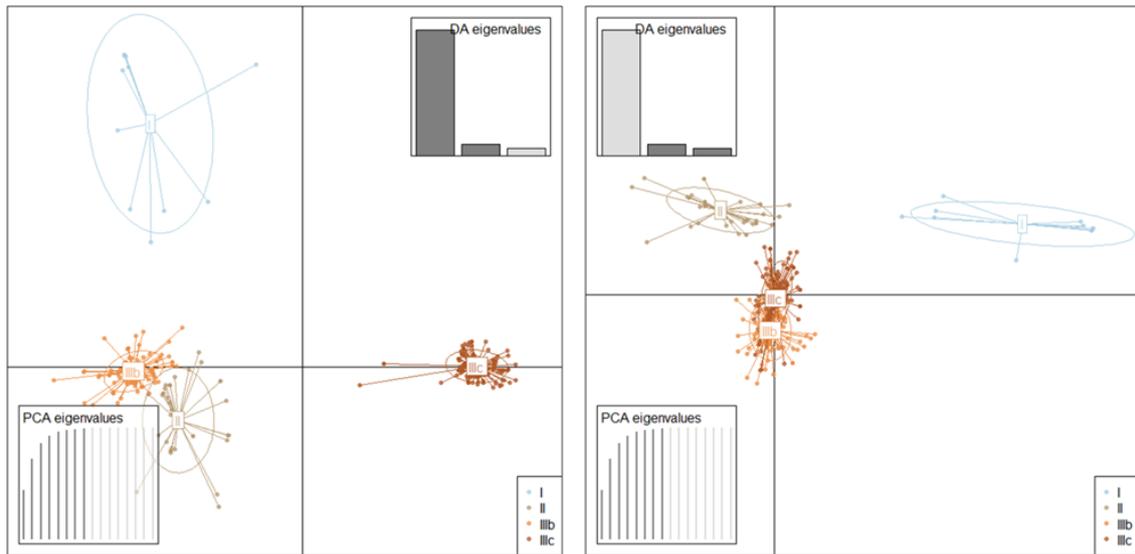


図 5. 2017年 *S. sonnei* 株を MLVA-MST。MLVA データからの推定系統で色分けした。

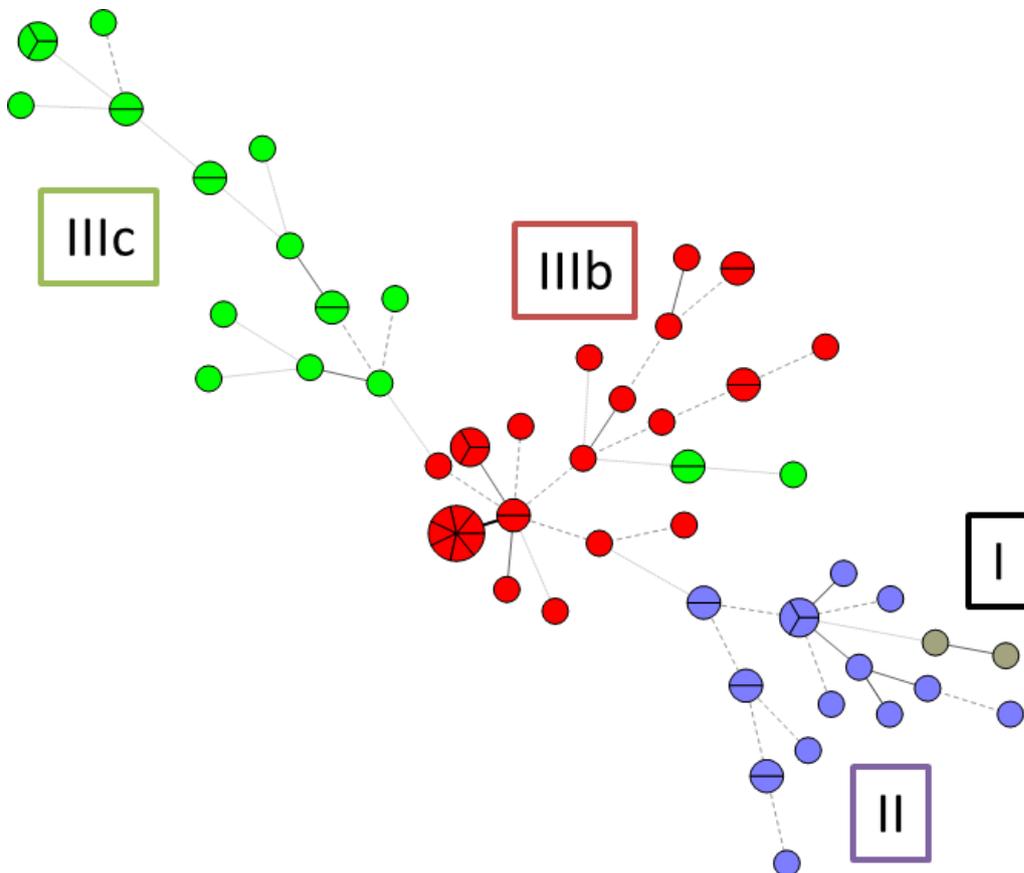


図 6. *S. flexneri* 3a MLVA-MST。左が従前の、右が 17 遺伝子座を追加したもの。色つきは single locus variant が変化した場所を表す。線上の数値は異なる遺伝子座の数を表す。

