

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	国立感染症研究所 細菌第一部
	千田 恭子	仙台市衛生研究所
	大屋 日登美	神奈川県衛生研究所
	磯部 順子	富山県衛生研究所
	田中 忍	神戸市環境保健研究所
	平塚 貴大	広島県立総合技術研究所
	吉野 修司	宮崎県衛生環境研究所

研究要旨 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。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レジオネラ迅速検査法の状況の把握を行った。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*: EAaggEC]) 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

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、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市販されていない混合血清をレファレンスセン

ターを通じて全国の地衛研に配布する。また、自治体におけるレジオネラ迅速検査の実施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; J Clin Microbiol. 56(6). pii: e00190-18. 2018) 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

2018 年に細菌第一部で受け付けたヒト由来の EHEC は全 3,338 株であり、その分布は、血清群 O157(55.3%)、O26(24.9%)、O103(4.9%)、O111(4.3%)、O121(2.3%)、O145 (1.6%)、その他 (6.7%) 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, EAaggEC, ETEC [enterotoxigenic *E. coli*: 腸管毒素原性大腸菌], EIEC [enteoinvasive *E. coli*: 腸管細胞侵入性大腸菌]) のコントロール株、EHEC のマーカー

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) の配布をいくつかの地方衛生研究所または保健所等へ行った。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が開発した大腸菌 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。

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、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。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。昨年度の報告以降、88 株が追加された。同一集団感染事例に由来するため重複していると考えられる菌株を除いた収集株 63 株の遺伝子型を表 1 に示した。2018 年 3 月末現在で、合計 614 株のレジオネラ属菌臨床分離株が収集できた。*L. pneumophila* が 603 株 (98.2%) 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。*L. pneumophila* の 603 株は、ST1 から ST2593 まで 235 種類の遺伝子型に分けられた。

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**

昨年度に引き続き、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。

2.3 地衛研におけるレジオネラ迅速検査の実態調査

地衛研におけるレジオネラ迅速検査の実態調査を行なった。回答のあった 74 地衛研中 40 地衛研で迅速検査が導入されていた。環境検体を検査対象としているのが 34 機関、臨床検体を対象としているのが 22 機関で、両方を検査対象としているのは 16 機関であった。臨床検体について迅速検査を行っている 22 地衛研のうち、全臨床検体で培養と並行して LAMP 法を行っているのが 17 機関、一部臨床検体で実施しているのが 5 機関であった。環境検体の迅速検査を実施している機関については、全検体で実施している機関、患者発生時に実施する機関、再検査に限っている機関、調査研究としてのみ行っている機関など実施状況はさまざまであった。迅速検査を導入している全ての地衛研で培養法が実施されており、培養法を迅速法に置き換えている機関はなかった。

D . 考察

一昨年度更新した「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 法との整合性解析から重症例由来の新規 O 群および血清型 (O:H 型) について明らかにする必要がある。

レジオネラ症は 2018 年には 2,000 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。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、自治体におけるレジオネラ迅速検査の導入状況が明らかとなった。半数以上の地衛研で、迅速検査が導入されていたがその運用の仕方はさまざまで、より効果的な実施方法を考えていかなければならない。

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

特記事項なし

G . 研究発表

論文発表

Amemura-Maekawa J, Kura F, Chida K, Ohya H, Kanatani JI, Isobe J, Tanaka S, Nakajima H, Hiratsuka T, Yoshino S, Sakata M, Murai M, Ohnishi M; Working Group for Legionella in Japan. *Legionella pneumophila* and other *Legionella* species isolated from legionellosis patients in Japan between 2008 and 2016. *Appl Environ Microbiol.* 2018. e00721-18.

学会発表

Fumiaki Kura and Junko

Amemura-Maekawa. Sources of infection and settings in outbreaks of legionellosis

-- Japan, 2000-2017. ESGLI 2018. Lyon,
August, 2018.

(予定を含む。)
なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

表1 レジオネラ・レファレンスセンター収集臨床分離株 (2017年4月~2018年3月)

No.	性別	感染源	NDB (菌株 PFGE 受付番号)	種名	血清 群	ST (Sequence Type)													Group (SG1)	同じSTの報告があるか
						flaA	gII	asd	mip	ompS	proA	neuA	flaA	gII	asd	mip	ompS	proA		
529	2017	男	温泉(推定)	3771	L. pneumophila	1	+	328	6	10	19	28	19	4	9	B1	国内2例目、国外(臨床2、環境5すべて1以外)			
530	2017	男	不明(トランク運搬手)	3772	L. pneumophila	1	+	2389	2	3	5	10	18	1	6	S1	無			
531	2017	男	入浴施設(集団感染、NDB3706と同じ施設、環境分離株と一致せず)	3775	L. pneumophila	1	+	89	4	10	11	15	29	1	6	(S1)	国内13例目、国外			
532	2017	男	温泉(三原市集団感染)	3778	L. pneumophila	1	+	2399	7	6	17	21	11	11	9	B2	無			
533	2016	男	不明	3779	L. pneumophila	1	+	15	12	9	26	5	26	17	15	N	国外臨床環境			
534	2017	男	不明(NDB3781と同一患者)	3780	L. pneumophila	1	+	687	7	6	17	21	35	11	9	B2	国内5例目			
535	2017	男	不明(NDB3780と同一患者)	3781	L. pneumophila	3	NA	2394	10	10	7	28	8	18	11	無				
536	2017	男	不明	3785	L. pneumophila	5	NA	2397	3	6	1	21	11	11	9	無				
537	2017	男	温泉(韓国、推定)	3786	L. pneumophila	1	+	2393	12	8	11	5	20	12	9	(S3)	無			
538	2017	女	温泉(三原市集団感染)	3787	L. pneumophila	1	+	2398	7	12	17	21	11	11	11	B2	無			
539	2017	女	不明(NDB3789と同一患者)	3788	L. pneumophila	5	NA	1032	3	13	1	6	14	9	38		国内3例目、国外			
540	2017	女	不明(NDB3788と同一患者)	3799	L. pneumophila	1	-	154	11	14	16	16	15	13	2	C2	国内2例目、国内外臨床環境			
541	2017	男	不明	3801	L. pneumophila	1	+	42	4	7	11	3	11	12	9	N	国内14例目、国外			
542	2017	男	温泉(推定、自宅マンションの共同浴場)	3802	L. pneumophila	1	+	461	6	10	14	28	21	14	9	B1	国内環境(SG6、12)、国外臨床環境			
543	2015	女	院内感染	3803	L. pneumophila	1	-	1	1	4	3	1	1	1	1	C1	国内19例目、国外			
544	2017	男	院内感染	3804	L. pneumophila	1	-	1	1	4	3	1	1	1	1	C1	国内20例目、国外			
545	2017	男	温泉(推定)	3809	L. pneumophila	1	+	2416	7	6	1	21	13	11	9	B2	国内環境(SG6、12)、国外臨床環境			
546	2015	女	不明	3810	L. pneumophila	9	NA	2415	12	15	11	40	10	12	24		国内19例目、国外			
547	2017	男	不明	3811	L. pneumophila	1	+	1077	3	6	1	1	14	11	1	U	国内2例目、国外			
548	2017	男	不明	3812	L. pneumophila	1	+	613	2	3	6	15	2	1	6	S1	国内5例目			
549	2017	男	不明(職業は配管工)	3826	L. pneumophila	2	NA	354	3	5	1	7	14	32	8	-	国内1例目、国外3例(全てSG2)			
550	2017	男	不明	3827	L. pneumophila	1	+	679	27	3	9	15	56	5	6	S1	国内6例目			
551	2017	男	不明(筒ざらしのコップでのうがい?)	3828	L. pneumophila	1	-	739	12	8	11	2	10	12	2	S3	国内4例目、日本・中国環境			
552	2017	男	不明	3830	L. pneumophila	1	+	2459	2	10	5	10	18	5	6	S1	無			
553	2017	男	不明(ゴルフ、その後入浴)	3831	L. pneumophila	2	NA	39	3	5	1	7	14	9	8	-	国内4例目、国外10例SG2			
554	2017	男	公衆浴場の清掃(遠伝子型一致せず)	3832	L. pneumophila	1	+	138	10	12	7	3	16	18	6	B3	国内23例目			
555	2017	男	不明	3833	L. pneumophila	1	+	2460	2	3	5	11	2	5	6	S1	無			
556	2017	男	公衆浴場の清掃(遠伝子型一致せず)	3834	L. pneumophila	1	+	701	21	14	29	15	29	6	N	国内4例目、国外多数				
557	2017	男	不明(職業は水まわりの設備工事・自営業)	3838	L. pneumophila	1	-	22	2	3	6	10	2	1	6	S1	国内環境、国外臨床・環境			
558	2017	男	不明(建設労働者)	3839	L. pneumophila	1	-	2478	6	10	14	5	39	4	9	(B1)	無			
559	2017	男	不明	3840	L. pneumophila	1	+	89	4	10	11	15	29	1	6	(S1)	国内15例目、国外			
560	2017	男	不明(電気工事(自営)、入浴施設の利用歴なし)	3841	L. pneumophila	1	+	591	5	2	22	15	6	10	6	S2	国外臨床1例			
561	2017	男	公衆浴場の利用有り(遠伝子型一致せず)	3855	L. pneumophila	1	+	2469	6	10	15	3	19	4	6	B1	無			
562	2017	男	不明	3859	L. pneumophila	3	NA	93	3	10	1	28	14	9	13	-	国外多、国内9例目			
563	2017	男	不明	3875	L. pneumophila	1	+	1926	2	10	3	15	9	14	6	B1	国外環境1例			
564	2017	女	不明	3876	L. pneumophila	1	+	2496	6	3	15	10	21	1	6	S1	無			
565	2017	男	不明	3877	L. pneumophila	1	+	23	2	3	9	10	2	1	6	S1	国内41例目、国外			
566	2017	男	温泉(三原市集団感染)	3890	L. pneumophila	1	+	2506	5	12	17	21	11	11	11	B2	無			
567	2017	男	不明(河川の堤防工事、炭・煙仕事)	3893	L. pneumophila	9	NA	1808	4	8	11	25	11	12	2	-	国内2例目			
568	2017	男	温泉(ホテル、推定)	3894	L. pneumophila	1	+	2505	6	10	15	3	98	14	9	B1	無			
569	2017	男	不明	3895	L. pneumophila	1	+	23	2	3	9	10	2	1	6	S1	国内42例目、国外			
570	2017	男	自宅メダカの水槽(LAMP)、推定)	3896	L. pneumophila	1	+	481	4	7	11	13	11	12	9	N	国外臨床			
571	2017	男	不明	3912	L. pneumophila	1	+	352	12	8	11	13	10	12	2	S3	国内4例目、国内環境			
572	2017	男	不明(建設業)	3913	L. pneumophila	1	+	973	2	3	5	15	2	1	6	S1	国内5例目			
573	2017	男	クーラー清掃(推定)	3914	L. pneumophila	1	+	553	3	6	1	3	14	11	9	U	国内3例目、国外			
574	2017	女	不明	3915	L. pneumophila	1	-	614	2	10	3	6	9	4	11	B1	国内環境			
575	2017	男	老人福祉施設、風呂拭い	3916	L. pneumophila	1	+	120	2	3	5	11	2	1	6	S1	国内28例目、国外			
576	2017	男	不明(雨天後自宅周辺の土砂等の掃除)	3917	L. pneumophila	1	+	905	2	3	9	13	56	5	6	S1	国内3例目			
577	2017	男	不明(子イサービス、ショートステイで入浴サービス)	3918	L. pneumophila	1	+	132	2	1	6	15	2	1	6	S1	国内5例目			
578	2017	男	温泉(湯水、)宿泊施設、NDB3922、3923と同一患者	3921	L. pneumophila	1	(+)	788	2	6	17	14	12	8	11	B2	国内2例目、国内外臨床・環境			
579	2017	男	温泉(湯水、)宿泊施設、NDB3921、3922と同一患者	3922	L. pneumophila	4		2586	6	10	75	6	17	14	11	無				
580	2017	男	温泉(湯水、)宿泊施設、NDB3921、3922と同一患者	3923	L. pneumophila	5		1632	3	6	1	6	14	9	220		国内環境			
581	2016	男	公衆浴場(推定、3か所利用)	3930	L. pneumophila	1	+	1798	7	10	17	10	13	4	11	B2	国内(県内)3例目			
582	2016	男	不明(末期癌)	3931	L. pneumophila	1	-	127	3	13	1	10	14	9	11	U	国内2例目、国内環境			
583	2017	男	不明	3932	L. pneumophila	1	+	307	6	10	19	14	4	4	3	B1	国内2例目			
584	2017	男	不明(アメリカ・グアム)	3933	L. pneumophila	1	+	2593	2	10	9	10	2	5	9	S1	無			
585	2017	男	不明	3934	L. pneumophila	1	+	353	8	10	6	15	51	1	6	S1	国内9例目			
586	2017	男	温泉(推定、韓国・釜山)	3935	L. pneumophila	1	+	2393	12	8	11	5	20	12	9	(S3)	国内2例目			
587	2016	男	不明(室内に山野草の鉢)	3942	L. pneumophila	1	+	23	2	3	9	10	2	1	6	S1	国内43例目、国外			
588	2017	男	浴槽水(自宅)	3943	L. pneumophila	1	-	739	12	8	11	2	10	12	2	S3	国内5例目、日本・中国環境			
589	2017	男	温泉(推定、血清型一致せず)	3944	L. pneumophila	3		2343	3	13	1	6	12	9	11		国内環境1例のみ			
590	2017	男	不明(職業は自動車整備)	3945	L. pneumophila	1	+	674	7	12	17	3	13	11	11	B2	国外(カナダ)1例のみ			
591	2017	男	不明(職業は建設業)	3946	L. pneumophila	1	+	256	6	10	14	5	39	14	9	(B1)	国内5例目、国外、国内環境(シャワー)			