

平成28-30年度
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 大西 真	国立感染症研究所 細菌第一部(平成29-30年度) 国立感染症研究所 細菌第一部(平成28年度)
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。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培養法および迅速検査法の状況把握を行った。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*: 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

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 (Statens 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 検査マニュアルの改訂

「腸管出血性大腸菌 (EHEC) 検査・診断マニュアル」の改訂版を作製し、感染研ホームページ上にアップロードした (2017 年 2 月)。

1.2 EHEC のサーベイランス

2016-2018 年に細菌第一部で受け付けたヒト由来の EHEC は全 8,952 株であり、その分布は、血清群 O157 (56.5%)、O26 (23.5%)、O103 (4.7%)、O111 (3.5%)、O121 (3.2%)、O145 (1.6%)、その他 (6.9%) であった。

1.3 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 [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。

1.4 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。

1.5 下痢原性大腸菌 EQA (External Quality Assurance) の実施

デンマーク血清学研究所 (Statens Serum Institut: SSI) がヨーロッパ各国間で実施している下痢原性大腸菌の EQA 用菌株 (2016 年用) 10 株を用いた。感染研以外で EHEC タイピング用自家抗血清の準備がある大阪府立公衆衛生研究所 (2016 年当時) へ上記の菌株を送付し、EQA を行

ったところ、すべての菌株において生化学的性状（ソルビトール発酵性、 β グルクロニダーゼ活性、ヘモリシン活性）血清型（O:H型）および病原性遺伝子型の解析結果が感染研と大阪府ですべて一致し、これらの結果は SSI から得られた解答と完全に一致した。

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。年度毎の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た2018年3月までの3年間に収集されたレジオネラ属菌臨床分離株は207株であった。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(表1)。*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、多様であった。

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

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は、3年間継続実施され、70-71地衛研が参加し(参加機関は一部入れ替わりがある)、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。

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

地衛研の98%で環境水のレジオネラ培養検査が実施されていた。地衛研をもたない保健

所設置市の一部は環境水のレジオネラ培養検査を他機関に委託していた。また、46%の地衛研で環境水のレジオネラ迅速検査を導入していた。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レジオネラ迅速検査実施状況はさまざまであった。

D. 考察

2017年2月に更新した「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。

レジオネラ症の感染源となりえる水系施設の衛生管理状態の把握のために不可欠なレジオネラ培養検査は、ほとんどの地衛研で実施されていた。外部精度管理への継続参加で、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た。また、迅速検査の導入度合いはさまざまであり、検査精度の担保と種々の検査法活用のためには、さらなる研修の実施等が必要と考えられた。*L. pneumophila*の遺伝子型とその生息環境には関連性が見られており、本菌の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。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。

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

1. Kuroki T, Amemura-Maekawa J, Ohya H, Furukawa I, Suzuki M, Masaoka T, Aikawa K, Hibi K, Morita M, Lee K, Ohnishi M, Kura F. Outbreak of Legionnaire's disease caused by *Legionella pneumophila* serogroups 1 and 13. *Emerg Infect Dis.* 23 : 349-351, 2017.
2. 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

1. Amemura-Maekawa J, Chida K, Ohya H, Isobe J, Kanatani J, Tanaka S, Nakajima H, Yoshino S, Ohnishi M and Kura F: Characterization for clinical *Legionella* species by *Legionella* Reference Center in Japan. ESGLI 2016. Amsterdam, September 2016.
2. 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.
3. Fumiaki Kura and Junko Amemura-Maekawa. Sources of infection and settings in outbreaks of legionellosis --- Japan, 2000-2017. ESGLI 2018. Lyon, August, 2018.

H . 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む。)
なし

表1 収集臨床分離株の内訳

2018年3月末日現在

<i>L. pneumophila</i> 603株 (98.2%)		<i>L. bozemanae</i> 1株 (0.2%)
SG1 533株 (86.8%)	SG9 8株 (1.3%)	<i>L. dumoffii</i> 1株 (0.2%)
SG2 11株 (1.8%)	SG10 3株 (0.5%)	<i>L. feeleii</i> 1株 (0.2%)
SG3 17株 (2.8%)	SG12 2株 (0.3%)	<i>L. londiniensis</i> 1株 (0.2%)
SG4 4株 (0.7%)	SG13 2株 (0.3%)	<i>L. longbeachae</i> 6株 (1.0%)
SG5 11株 (1.8%)	SG14 1株 (0.2%)	<i>L. rubrilucens</i> 1株 (0.2%)
SG6 8株 (1.3%)	SG15 1株 (0.2%)	
SG8 1株 (0.2%)	Untypable* 1株 (0.2%)	
計 614株 (100%)		

*デンカ生研レジオネラ免疫血清ニューモフィラ1-15群のいずれにも反応しなかった。