

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を強化するための研究」
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
	大森 恵理子	仙台市衛生研究所
	大屋 日登美	神奈川県衛生研究所
	金谷 潤一	富山県衛生研究所
	中西 典子	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。非運動性大腸菌のHg型について解析し、重症例に特異的なHg型が存在することを見出した。レジオネラ・レファレンスセンターでは、レジオネラ属菌検出法の確立と普及のため、病原体検出マニュアル「レジオネラ症」の改訂と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。本研究では 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・精度管理を行うことを目的とする。

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。病原体検出マニュアルを改訂する。

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

レジオネラ症の主要な起因菌である *Legionella 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://bioinformatics.phe.org.uk/legionella/legionella_sbt/php/sbt_homepage.php、2021年3月時点で一時休止中)

C. 研究結果

1.1 EHEC のサーベイランス

2020年に細菌第一部で受け付けたヒト由来の EHEC は全 2,271 株あり、その分布は、血清群 O157 (51.9%)、O26 (18.3%)、O103 (7.7%)、O111 (4.1%)、O121 (2.8%)、O145 (1.2%)、その他 (29.8%) であり、2020年の分離総数は 2016-2019年の平均分離数の約 82% であり、新型コロナウイルス感染症による影響は限定的であったと言える。

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 同一 O 群における重症例特異的な Hg 型の同定

大腸菌 H-genotyping PCR 法 (大腸菌の H 型を PCR で決定できる手法)を用いて H (べん毛)抗原が陰性 (すなわち非運動性)の Hg 型を解析し、重症例特異的な Hg 型が存在することを見出し、O5:H/Hg9 型、O55:H/Hg7 型などを同定した。

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。2020年は41株が収集されたが、これは昨年の半数程度であり、株数の減少は、新型コロナウイルス感染症流行で呼吸器検体採取手控えの影響を受けた可能性もある。2020年12月末現在で、合計796株のレジオネラ属菌臨床分離株が収集できた。*L. pneumophila*が782株 (98.2%)で、血清群1が698株と全体の89%を占めていた (表1)。*L. pneumophila* については、SBT法による遺伝子型により273種類のST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

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 病原体検出マニュアルの改訂

病原体検出マニュアル「レジオネラ症」について 2011 年以來となる全面改訂を行い、2020 年 9 月に発出した。科学的知見に基づいた最新の培養検査法および新しい DNA 検出法や、解析法等を記載した。

2.4 市販されていないレジオネラ免疫血清の配布

レジオネラ・レファレンスセンターを通じて地方衛生研究所にアンケートをとり、希望の多かった市販されていない *L. pneumophila* 混合免疫血清およびレジオネラ属菌免疫血清の受託作製をデンカ(株)に依頼し、地方衛生研究所に配布した。

D. 考察

EHEC の検査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。非運動性株の Hg 型についてさらに解析を進める必要がある。

レジオネラ症は 2018 年以來、毎年 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。外部精度管理サーベイの継続参加は検査精度の安定化が期待できる。

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

Nakamura I, Amemura-Maekawa J, Kura F, Kobayashi T, Sao A, Watabane H, Matsumoto T. Persistent *Legionella* contamination of water faucets in a tertiary hospital in Japan. Int J Infect Dis. 93:300-304, 2020.

Seto J, Amemura-Maekawa J, Sampei M, Araki K, Endo M, Kura F, Ikeda T, Kato T, Ohnishi M, Mizuta K. Investigation of a Legionnaires' disease outbreak using direct sequence-based typing in Yamagata City, Japan, 2019. Jpn J Infect Dis. DOI: 10.7883/yoken.JJID.2020.815, 2021.

金谷潤一、磯部順子、山口友美、武藤千恵子、淀谷雄亮、飯高順子、佐々木麻里、田栗利紹、蔡 国喜、川野みどり、倉 文明、前川純子. 環境水を用いた各種レジオネラ属菌迅速検査法の有用性の評価. 日本防菌防黴学会誌. 48:515-522, 2020.

大河内由美子、泉山信司、前川純子. 水の衛生管理 3. 貯水槽水道で滞留した水道水からのレジオネラ属菌および関連微生物の検出状況. 日本防菌防黴学会誌. 48:377-382, 2020.

学会発表

前川純子. レジオネラ症の疫学. 第94回日本感染症学会総会・学術講演会シンポジ

ウム22. 2020年8月. 東京.

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

表1 レジオネラ・レファレンスセンター臨床分離収集状況

収集臨床分離株の内訳		2020年12月現在	
<i>L. pneumophila</i> 782株 (98.2%)		<i>L. anisa</i>	1株 (0.1%)
SG1 698株 (91.8%)	SG9 9株 (1.1%)	<i>L. bozemanai</i>	1株 (0.1%)
SG2 15株 (1.9%)	SG10 5株 (0.6%)	<i>L. dumoffii</i>	1株 (0.1%)
SG3 18株 (2.5%)	SG12 2株 (0.3%)	<i>L. feeleii</i>	2株 (0.3%)
SG4 4株 (0.5%)	SG13 2株 (0.3%)	<i>L. londiniensis</i>	1株 (0.1%)
SG5 12株 (1.5%)	SG14 1株 (0.1%)	<i>L. longbeachae</i>	7株 (0.9%)
SG6 10株 (1.3%)	SG15 1株 (0.1%)	<i>L. rubrilucens</i>	1株 (0.1%)
SG7 2株 (0.3%)			
SG8 2株 (0.3%)	UT* 1株 (0.1%)		
		計	796株 (100%)