

## 第 3 章 調査研究・報告

### 第 3 節 資 料



## 奈良県で分離された非定型な生化学的性状を示す腸管出血性大腸菌 O157 について

井上ゆみ子・平城 均・井ノ上美紅・田中慶哉・築山結衣・井上健太郎・森村実加・内田美枝

Detection of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 with Atypical Biochemical Characteristics in Nara PrefectureYumiko INOUE・Hitoshi HEIJO・Miku INOUE・Keiya TANAKA・Yui TSUKIYAMA・  
Kentarō INOUE・Mika MORIMURA and Yoshie UCHIDA

## 緒言

腸管出血性大腸菌(enterohemorrhagic *Escherichia coli*: EHEC)は、ベロ毒素(VT)を産生する病原体として感染症法上の四種病原体に分類される。EHECは、菌体表面の糖鎖に由来する O 血清群及び鞭毛タンパクに由来する H 血清型により分類され、多様な血清型が存在する。なかでも EHEC O157:H7 は病原性が高い血清型としてよく知られている。EHEC を原因とした食中毒・集団感染事例は全国で毎年のように発生し、ときに死亡例が報告される。奈良県においても年間数十例の有症患者及び無症状病原体保有者が届出られており、当センターではこれらの分離株について各種の試験検査を実施し、結果を国へ報告している。

令和3年度に奈良県内で発生届のあった EHEC O157 感染事例において、患者及び濃厚接触者から分離された菌株の試験検査を実施したところ、非定型な生化学的性状を示すことが判明した。今回、本事例で分離された菌株について報告する。

## 材料と方法

## 1. 材料

令和3年11月28日に発症し、12月7日に県内クリニックから保健所へ三類感染症発生届がされた EHEC O157(VT1,VT2) 感染症患者からの分離菌1株(菌株番号: R03V41)、及び無症状の濃厚接触者便から分離された菌1株(同: R03V40)を対象とした。患者及び無症状の濃厚接触者は、同居する小学生のきょうだいであった。

## 2. 方法

## 1) 前培養

試験検査に先立ち、対象菌株を普通寒天培地(日水製薬)に接種し、37°Cで20時間培養した。

## 2) 生化学的性状試験

性状確認は、分離菌を TSI 寒天培地、LIM 培地、X-MG 培地(以上、日水製薬)、シモンズのクエン酸 Na

培地及びメラー・オルニチン培地(以上、栄研化学)に接種し、37°Cで20時間培養して行った。また、全自動細菌同定検査装置 VITEK2 Compact システム(ピオメリュー・ジャパン)の GN 同定カード試験により菌種確認を実施した。

## 3) O 血清群別試験

病原大腸菌免疫血清「生研」(デンカ)を用い、添付の説明書に準じて O 血清群別試験を実施した。

## 4) H 血清型別試験

感染症サーベイランス事業において国立感染症研究所で実施された対象菌株の検査結果を参照した。

## 5) VT 遺伝子検査

ベロ毒素 VT1 及び VT2 をコードする遺伝子を標的とする PCR 法<sup>1,2)</sup>により、検出を行った。

## 6) ベロ毒素産生性

毒素検出は、VTEC-RPLA(デンカ)を用いた逆身ラテックス凝集反応により実施した。

## 7) MLVA

感染症サーベイランス事業において国立感染症研究所で実施された対象菌株の検査結果を参照した。

## 結果

## 1. 生化学的性状試験

試験の結果を表1に示す。R03V40及びR03V41の両菌株ともに、インドール産生性が陰性であることをのぞき、典型的な O157 の性状を示した。VITEK2 による菌種同定試験では、2株ともに98%の確率で「*Escherichia coli* O157」であるとの結果を得た。

## 2. O 血清群別試験

O 血清群別では、2株とも O157 免疫血清に特異的凝集を示した。

## 3. H 血清型別試験

国立感染症研究所で実施された H 血清型別では、2株とも H7 との結果を得た。

## 4. VT 遺伝子検査

表 1 生化学的性状検査結果

菌株番号	乳糖・白糖利用能	ブドウ糖利用能	硫化水素産生	ガス産生	リジン脱炭酸酵素	インドール産生	運動性	β-グルクロニダーゼ産生	アクエンモニウム塩利用能	オルニチン産生
R03V40	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+
R03V41	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+
典型的 EHEC O157	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+

+ : 陽性, - : 陰性

2 株とも VT1 及び VT2 遺伝子陽性であった。

### 5. ペロ毒素産生性

VTEC-RPLA の結果は、2 株ともに VT1 陽性、VT2 陽性であった。対照として毒素型が既知の EHEC O21(VT1)株、EHEC O157(VT2)株及び EHEC O157 (VT1,VT2) 株も同時に試験を実施し、それぞれ矛盾のない結果を得た。

### 6. H 血清型別及び MLVA

国立感染症研究所における検査結果は、2 株ともに 21m0233 であった。

### 考 察

腸管出血性大腸菌は、血清型や毒素型において多様性を示す。EHEC 感染症の届出は、全国で毎年数千件にのぼり、分離菌株は地方衛生研究所及び国立感染症研究所において詳細に解析されている<sup>3)</sup>。我が国では、リジン脱炭酸酵素が陰性の EHEC O157 株や、リジン脱炭酸酵素陰性に加えてインドール陰性かつ運動性陰性を示す EHEC O101 株や O111 株などの非定型株が過去に報告されている<sup>4,5)</sup>。しかし、インドール陰性を示す EHEC O157 株の分離は、著者の知る限りにおいて見いだせていない。インドール産生性は、EHEC O157 血清群鑑別の重要な指標であり、陰性の場合には培養段階のスクリーニング検査で O157 陰性と判定されることが危惧される<sup>6)</sup>。

本事例は、EHEC 感染症として医療機関で診断された有症患者及び濃厚接触者からの分離菌を対象としたことから、毒素遺伝子を含めた詳細な検索により確認することができた。これら 2 株は、インドール陰性であることを除き、血清学的及び生化学的性状において典型的な EHEC O157 であることを示した。さらに、MLVA 型は 21m0233 と分類され、遺伝子学的類似株が広域で分離されたことが判明している。米国におい

てもインドール陰性の EHEC O157 株分離例が報告されており<sup>7)</sup>、今回の結果は我が国にも同様の株が潜在的に存在する可能性を示すものである。

今回の事例は、生化学的性状で菌種及び O 血清群鑑別を行う場合、複数の鑑別手法で確認することの重要性を再確認させるものであった。今後、インドール陰性を示すメカニズムや遺伝子学的類似株との疫学的関連性について検討を進めることが重要と考えている。

### 謝 辞

腸管出血性大腸菌サーベイランス事業に関係する県内医療機関、県保健所、国立感染症研究所細菌第一部の皆様へ感謝申し上げます。

### 文 献

- 1) 国立感染症研究所：腸管出血性大腸菌 (EHEC) 検査・診断マニュアル (2021)
- 2) Cebula TA, Payne WL, Feng P: *Microbiol. Immunol.* 37, 543-548 (1995)
- 3) 国立感染症研究所：病原微生物検出情報, 43, 103-104 (2022)
- 4) 菊池理慧, 千葉一樹, 菅野奈美, 他：福島県衛生研究所年報 31, 56-58 (2013)
- 5) 高良武俊, 岡野祥, 新垣絵理, 他：沖縄県衛生環境研究所報 49, 35-37 (2015)
- 6) “Microbiological Method for Environment, Food and Pharmaceutical Analysis” Chauhan A, Jindal T: (2020)
- 7) Bopp CA, Greene KD, Downes FP, et al.: *J. Clin. Microbiol.* 25, 1486-1489 (1987)

## 河川水中から分離された薬剤耐性菌について

井ノ上美紅・吉田孝子・内田美枝

## Research of Antibiotic Resistant Bacteria Isolated from River Water in Nara

Miku INOUE・Takako YOSHIDA and Yoshie UCHIDA

## 緒言

抗菌性物質の不適切な使用等を背景とした薬剤耐性菌の世界的な増加が問題となっている。日本では、2016年から薬剤耐性アクションプランにより対策を開始し、人・動物・環境などの分野が連携して取り組むワンヘルス・アプローチが重要とされている。薬剤耐性菌や抗菌薬によって汚染された河川水等から薬剤耐性菌が検出される事例が報告されている<sup>1,2)</sup>が、環境分野での取り組みは遅れている。そこで、今回、奈良県内河川の薬剤耐性菌による汚染状況を調査した。

## 材料と方法

## 1. 材料

奈良県内で流域人口の多い大和川の、上流及び下流の2地点(A, B)について、2020年8月に2Lずつ採水を行った(図)。

## 2. 方法

## 1) 薬剤耐性菌の分離

2019年度調査研究にて確立した手法に従い、試料は3段階の濃度に調整した。調整した濃縮液をアンピシリン(ABPC)、テトラサイクリン(TC)、ホスホマイシン(FOM)、セフトキサシム(CTX)、メロペネム(MEPM)(富士フィルム和光純薬)の薬剤を添加した培地にそれぞれ塗抹、培養し、大腸菌様コロニーを分離した。また、CTX添加培地に生育した大腸菌群様コロニーを分離した。

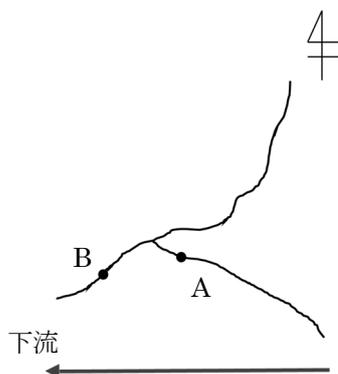


図 大和川の採水地点

## 2) ディスク拡散法による薬剤感受性試験

分離したコロニーについて、ディスク拡散法(Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) 準拠)による薬剤感受性試験を実施した。供試薬剤はABPC, TC, FOM, CTX, セフトドキシム(CPDX), ゲンタマイシン(GM), カナマイシン(KM), ストレプトマイシン(SM), シプロフロキサシン(CPFX), ナリジクス酸(NA), ST合剤, クロラムフェニコール(CP)(日本BD)の12薬剤とした。

## 3) 菌種同定

12薬剤のいずれかに耐性、もしくは中間耐性を示した菌株に対し、全自動細菌検査装置(VITEK2 Compact, ビオメリュー)等を用いた生化学的性状試験を実施した。更に16S rRNA遺伝子領域の塩基配列をダイレクトシーケンスにより決定し、National Center for Biotechnology Information (NCBI)のBLAST解析を実施した。

## 4) ディスク拡散法によるβ-ラクタマーゼ産生性確認試験

12薬剤のうち、セフェム系薬剤(CTX, CPDX)に耐性を示した菌株について、確認試験を行った。

基質特異性拡張型β-ラクタマーゼ(ESBL)産生性確認試験として、CTXとセフトジジム(CAZ)の間に、アモキシシリン・クラバン酸(AMPC/CVA)とアンピシリン・スルバクタム(ABPC/SBT)のディスク(日本BD)を配置し、CTXとCAZの阻止円径の比較及びCVAとSBTによる阻害効果を確認した。結果については、国立感染症研究所による薬剤耐性菌研修会資料<sup>3)</sup>に記載の判定基準に基づき、CTX-M型、TEM型、SHV型、判定保留の判定を行った。

AmpC β-ラクタマーゼ(AmpC)産生性確認試験として、セフメタゾール(CMZ)とセフミノクス(CMNX)のディスク及びAmpC活性阻害剤である3-アミノフェニルボロン酸(APB)500 μgを添加したCMZとCMNXのディスクを使用した。いずれかの薬剤ディスクにおいて阻止円径の拡張が5 mm以上ある場合を陽性と判定した<sup>1)</sup>。

### 5) $\beta$ -ラクタマーゼ遺伝子型確認試験

PCR 法により ESBL 遺伝子<sup>4,5)</sup> (TEM-型, SHV-型, CTX-M-1 group, CTX-M-2 group, CTX-M-9 group) 及び AmpC 遺伝子<sup>3)</sup> (MOX 型, CIT 型, DHA 型, ACC 型, EBC 型, FOX 型) の保有の有無を確認した。

### 結果

#### 1. 薬剤耐性菌の分離

地点 A のサンプルでは大腸菌様コロニーの生育が認められなかった。地点 B のサンプルで生育が認められた大腸菌様コロニー及び CTX 添加培地に生育した大腸菌群様コロニーについて、各薬剤添加培地から最大 5 コロニーずつ計 11 株釣菌した。

#### 2. 薬剤感受性試験

分離した 11 株に対して薬剤感受性試験を実施した結果を表 1 に示す。11 株のうち 7 株が 12 薬剤のいずれかに耐性、もしくは中間耐性を示した。そのうち 5 株は多剤耐性傾向を示した。

#### 3. 菌種同定

12 薬剤のいずれかに耐性及び中間耐性を示した 7 株は、生化学的性状試験の結果、*Escherichia coli* が 6 株、*Enterobacter cloacae* complex が 1 株であった。更に、*E. cloacae* complex 1 株については 16S rRNA 遺伝子領域の塩基配列を決定し、BLAST による相同性解析を実施した。その結果、*Enterobacter kobei* と 99.9% 配列が一致した。

表 1 薬剤感受性試験の結果

菌株番号	ABPC	CTX	CPDX	GM	KM	SM	TC	CPFX	NA	ST	CP	FOM
1	R	R	R	S	S	R	R	S	S	R	R	R
2	R	R	R	S	S	R	S	R	R	R	S	S
3	R	R	R	R	S	S	S	S	S	R	R	R
4	S	S	S	S	S	R	R	S	S	R	I	S
5	R	S	S	S	S	R	R	S	S	I	S	S
6	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
7	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
8	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
9	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
10	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
11	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S

R: 耐性型, I: 中間耐性, S: 感受性

### 4. ディスク拡散法による $\beta$ -ラクタマーゼ産生性及び遺伝子型確認試験

前述の 7 株のうち、多剤耐性傾向を示し、また、セフェム系薬剤 (CTX, CPDX) に耐性を示した 3 株 (菌株番号 1~3) について、ディスク拡散法による  $\beta$ -ラクタマーゼ産生性及び遺伝子型確認試験を実施した。その結果、*E. coli* 2 株が ESBL 産生性、*E. kobei* 1 株が AmpC 産生性を示した。PCR 法による確認を行ったところ、ESBL 産生性の 2 株は、それぞれ CTX-M-9 group+TEM-型、CTX-M-9 group であった。AmpC 産生性の 1 株は検査対象のいずれの遺伝子も検出しなかった (表 2)。

### 考察

今回の調査の結果、奈良県内の河川水中に  $\beta$ -ラクタマーゼ産生菌が存在することが明らかとなった。更に、プラスミド性の薬剤耐性遺伝子の保有も確認されたことから、感性菌や他菌種への伝播の恐れがあることも判明した。また、採水した地点間でコロニーの生育に差異が認められたことから、人口密集地を流れる河川の合流や付近の施設からの流出水等の影響が考えられた。ヒト由来耐性株による河川水の汚染は、飲料水や圃場散水等を介し、ヒトの健康に影響を及ぼす可能性が大きいことが懸念される。ヒト由来の、遺伝子伝播性をもった多剤耐性菌による河川水等の環境汚染の実態については、今後も継続して監視する必要がある。

### 文献

- 1) 佐々木美江, 矢崎知子, 齋藤紀行, 他: 宮城県保健環境センター年報, 26, 31-34 (2008)
- 2) 木下輝昭, 小田智子, 守安貴子, 他: 東京都健康安全研究センター年報, 71, 225-232 (2020)
- 3) 国立感染症研究所細菌第二部第一室「薬剤耐性菌研修会資料」(2016年9月)
- 4) Xu, L, Ensor, V, Gossain, S, et al. : *J. Medical Microbiology*, 54, 1183-1187 (2005)
- 5) Monstein, H, Ostholm-Balkhed, A, Nilsson, M, et al. : *APMIS*, 115, 1400-1408 (2007)

表 2  $\beta$ -ラクタマーゼ産生性及び遺伝子型確認試験の結果

菌株番号	菌種	阻害剤による確認試験		PCR法による検出遺伝子	
		CVA, SBT (ESBL)	APB (AmpC)	ESBL	AmpC
1	<i>Escherichia coli</i>	+	-	TEM-型, CTX-M9G	-
2	<i>Escherichia coli</i>	+	-	CTX-M9G	-
3	<i>Enterobacter kobei</i>	-	+	-	-

## ジビエ収去検体に付着していた異物について

田中慶哉・森村実加・井上ゆみ子・内田美枝

### Foreign Matter Adhering to the Jibie Collection Sample

Keiya TANAKA・Mika MORIMURA・Yumiko INOUE and Yoshie UCHIDA

#### 緒言

令和3年度、食品収去検体として搬入されたジビエ（鹿肉）に異物の付着を認めた。顕微鏡で異物の外観を確認したところ、生存しているマダニである可能性が判明した。マダニは、ライム病や日本紅斑熱、重症熱性血小板減少症候群（SFTS）などの各種感染症を媒介する。また、マダニの種類によって媒介する病原体が異なることから、マダニの種鑑別が疫学上重要となる。そこで、ジビエ肉の消費者や製造業者への感染リスクへの注意喚起、および感染予防を目的とし、マダニの形態学的、および遺伝子学的同定法について検討し、今回付着していた異物について種鑑別を実施した。

#### 材料と方法

##### 1. 材料

以下の食品収去検体に混入していた異物（マダニ様）

搬入日 令和3年11月29日

搬入保健所 奈良県Y保健所

品名 鹿肉

状態 解体直後に採取、包装前、獣毛付着

##### 2. 方法

###### 1) 形態学的同定法

デジタル顕微鏡（KEYENCE VHX-2000）を用いて形態写真（倍率×20～200）を撮影し、山内らの方法<sup>1)</sup>を参考に発育ステージ、雌雄、属、種についてそれぞれ識別を実施した。

###### 2) 遺伝子学的同定法

DNeasy Blood&Tissue Kit（Qiagen）を用いて、高野らの方法<sup>2)</sup>を参考にDNA抽出を行った。

###### (1) 系統解析

抽出したDNAからPCR法でmt-rrs配列を検出し、シーケンス解析（SeqStudio；Thermo Fisher Scientific）を実施した。

###### (2) PCR-RFLP法を用いた解析

赤地らの方法<sup>3)</sup>を参考に、抽出したmt-rrs遺伝子を制限酵素（BstYI）による処理の後、電気泳動による

検出バンドのパターン解析を行った。

#### 結果

##### 1. 形態学的同定

###### 1) 発育ステージ

脚を8本認め、体長は約3mmであった。腹面には肛門のみが開口しており、成虫に見られる生殖門がないことから吸血している若虫であると判断した（図1）。

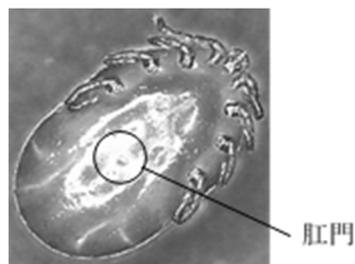


図1 腹面の透過光画像

###### 2) 雌雄の識別

若虫であることから雌雄の判別は不可能であった。

###### 3) 属の識別

背面の色斑を認めず（図2）、肛溝が肛門の後方を囲む状態から（図2）チマダニ属（*Haemaphysalis*）の可能性が高いと判断した。なお、花彩（複数の浅い切れ込みによりできる模様）は、吸血後であることから識別不可であった。

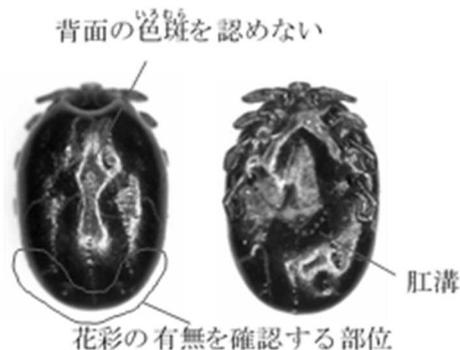


図2 対象マダニの反射光画像

###### 4) 種の識別

体色は、吸血の影響で黒ずんだ茶褐色であり、宿主はニホンジカであった。以上のことからフタトゲチマ

ダニ，もしくはオオトゲチマダニであると判断した。

フタトゲチマダニの成虫は，晩春～夏に見られ，オオトゲチマダニの成虫は，秋～初春に見られる。若虫は，吸血後宿主から離脱し，2週間程度で脱皮を行い，成虫になるとされる。対象のマダニは，11月製造の鹿肉から検出されたことからオオトゲチマダニであると推測された。

## 2. 遺伝子学的同定

### 1) 系統解析

検出したマダニ *mt-rrs* 遺伝子の系統解析<sup>4)</sup>の結果を図3に示す。対象のマダニは，オオトゲチマダニ (*Haemaphysalis megaspinosa*)，ヤマトチマダニ (*Haemaphysalis japonica*)，ダグラスチマダニ (*Haemaphysalis douglasi*) の近縁であった。

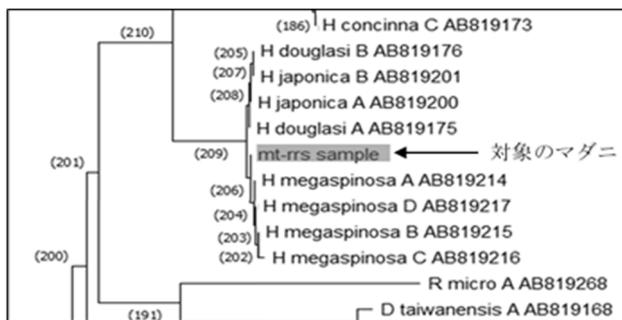


図3 マダニの系統解析結果

### 2) PCR-RFLP法を用いた解析

検出したマダニ *mt-rrs* 遺伝子を制限酵素 (*Bst*YI) で切断し，得られたパターンは約330 bp，70 bp，40 bpであり，オオトゲチマダニのパターン<sup>3)</sup>と一致した (図4)。

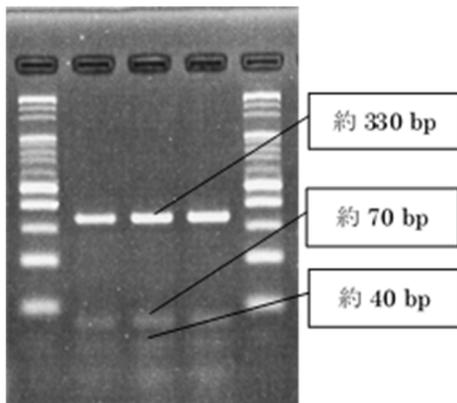


図4 酵素処理後の泳動結果

## 考 察

種鑑別において遺伝子学的同定と形態学的同定の結果に差が生じることは，マダニに限らず多くの生物で知られている<sup>3)</sup>。形態学的同定とマダニ由来 *mt-rrs* 遺伝子を用いた遺伝子学的同定に大きな乖離は現在のところ報告されていないが，オオトゲチマダニ，ヤマト

チマダニ，およびダグラスチマダニは1，2塩基の差であるため，容易にデータベースとの一致率で決定すると誤同定の可能性が指摘されている<sup>2)</sup>。そのため，遺伝子学的同定は形態学的同定の補助的手段と位置付けられている。今回，形態学および遺伝子学的同定を実施し，さらに活動時期を考慮した結果，対象のマダニはオオトゲチマダニと同定した。オオトゲチマダニを媒介とする感染症は，日本紅斑熱，SFTS，アナプラズマ感染症などがある。対象のマダニは生存しており，ジビエ製造業者等への感染の恐れがあった。また，対象のマダニが雌であった場合は産卵による食品，施設の汚染や，一部の病原体 (日本紅斑熱を引き起こすリケッチア属細菌やSFTS ウイルスなど) では卵から感染 (経卵感染) する可能性があった<sup>5)</sup>。ジビエ製造業者が食品を製造する際には，マダニに咬まれないよう注意が必要である。具体的には，肌を露出しない服装をすること，ズボンの裾を靴下や長靴の中に入れる，首回りにタオルを巻くようにする，ジビエの解体後の服装は熱湯に浸け付着したマダニをできるだけ死滅させる，湯船に浸かり身体にマダニが付着していないか確認する等である。また，施設の汚染対策としては，解体で皮を剥いだ後に床や壁に落ちたマダニを水で洗い流すなど，解体後すぐに清掃する (十分に吸血をし，雄と交尾したマダニは6～8日後に産卵を開始する) 等が衛生管理上必要である。なお，食品収去検体へのマダニ付着の一件は，担当保健所により，業者へ伝達された。

今回の事例から，マダニは山林や草むらに潜むのみならず，身近な食品からも，生活環境に入り込む恐れがあることが示された。同様な事例が発生した際にも，迅速に種鑑別を行うことで，消費者や製造者への感染対策に有益な情報が提供できると考える。

## 文 献

- 1) 山内健生，高田歩：ホシザキグリーン財団研究報告 18, 287-305 (2015)
- 2) 高野愛，マダニの遺伝学的な型別 (同定) のために (初心者編)，山口大学
- 3) 赤地重宏，楠原一，永井佑樹：ダニ研究 12 (2017)
- 4) Takano A, Fujita H, Kadosaka T, et al.: *Medical Entomology and Zoology*, 65, 13-21 (2014)
- 5) Luo LM, Zhao L, Wen H L, et al.: *Emerg. Infect. Dis.*, 21, 1770-1776 (2015)