

200500632A

厚生労働科学研究費補助金
新興再興感染症研究事業

食品由来の2類感染症のリスクアセスメントモデル
構築に関する研究

平成17年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 山本 茂貴
国立医薬品食品衛生研究所 食品衛生管理部

平成18(2006)年3月

目 次

I. 総括研究報告書

- 食品由来の2類感染症のリスクアセスメントモデル構築に関する研究 ----- 1
主任研究者 山本茂貴

II. 分担・協力研究報告書

1. 2類感染症の発生状況とリスクファクターに関する研究----- 1 5
分担研究者 岡部信彦
研究協力者 伊藤健一郎、忠之、山下和予、松野重夫、太田正樹、小林幹子、森山和郎
飯田真里子、松崎充宏
2. 細菌性赤痢、コレラにおける食品一人感染、人一人感染の疫学調査 ----- 2 3
分担研究者 相楽裕子、研究協力者 山下和予、腸炎研究会
3. 日本国内での食品由来腸チフス・パラチフスの発生に関する調査----- 2 5
分担研究者 渡辺治雄、研究協力者 廣瀬健二
4. 食品における赤痢菌検出法の標準化と感度の向上----- 2 9
分担研究者 牧野壮一 研究協力者 川本恵子、門田修子、武士甲一
5. 食品からのコレラ菌検出法に関する検討----- 3 3
主任研究者 山本茂貴
研究協力者 五十君静信、朝倉宏、石和玲子、荒川英二、高橋直樹

厚生労働科学研究費補助金（新興再興感染症研究事業）

総括研究報告書

食品由来の2類感染症のリスクアセスメントモデル構築に関する研究（H17-新興-013）

主任研究者 山本 茂貴 国立医薬品食品衛生研究所 食品衛生管理部 部長

研究要旨

我が国では、一部を除いて2類感染症は常在していないと考えられている。そのため、国内で感染したと思われる事例は輸入食品が原因と推定されるが、特定するのは困難である。2類感染症とその原因食品の情報を収集し、リスクファクターを解析する。

本年度は、(1) 2類感染症発生状況を2001年からの感染症発生動向調査をもとに解析した。いまだに国内発生があり、赤痢では2割程度、100例近くが毎年報告されている。また、コレラ患者の詳細な記述疫学から、患者側にも魚介類の生食や胃切除歴等、潜在的な危険因子が推定された。現行法では解析疫学を行うには困難が伴うため、より精細な調査法を検討する必要がある。(2) 原因食品情報を、ホームページ、発表論文から収集した。原因食品は、生食に供される食品が多い。大規模な集団発生を起こしたのは、パセリ、葉ネギ、レタスなど農産物であった。喫食調査の際にはこれらの食品も念頭に置いて、調査票を作成する必要があると思われる。(3) パイロット試験として食材を検査した。2類感染症の原因物質（細菌）と性状がよく似ている菌が分離された。2類感染症常在地域からの輸入食品について監視が必要と思われる。

腸チフス・パラチフスは食品や水を介してヒトからヒトに感染する。1960年代までは日本国内でも飲食物や水を介した腸チフス・パラチフスの発生がみられていた。近年では、上下水道が整備され衛生状態がよくなったため日本国内での腸チフス・パラチフスの発生は激減した。しかし、依然として海外の発展途上国では旅行者が食品や水を介して腸チフス・パラチフスに感染している。本研究では、日本国内において食品・水を介した腸チフス・パラチフスの発生が現在でも日本にあるかを調査することが目的である。調査の結果、食品が原因とは言い切れないが疑わしい例があったため、その菌株を解析した結果を報告する。

コレラ症は二類感染症の1つに指定されており、感染した場合には急性経過で水溶性下痢、脱水などの重篤な症状を呈することから、危惧すべき感染症である。わが国における発生は海外渡航者のみならず、近年では国内感染例が増加傾向にあり、その原因の一つとしては、食品を介した感染経路が考えられている。従って、食品からの本菌の検出法の精度・感度の向上は食品安全上、非常に重要である。本研究では、魚介類からのコレラ菌検出に関する通知検査法に基づく検査の結果、冷凍輸入食品の一部でコレラ菌擬陽性として報告された例について分離株の諸性状を検討し、擬陽性反応の原因究明を行った。加えて、一次増菌及びPCR条件を中心に検討を行い、効率よ

い検査手法の構築に向けた基礎的検討として改良すべき点を挙げた。

赤痢菌は、グラム陰性桿菌で細菌性赤痢感染症の原因菌であり二類感染症の1つに指定されている。細菌性赤痢感染症は海外感染例がほとんどであったが、近年は国内感染例が増加傾向にある。その原因として、食品媒介感染が考えられている。しかし、発症菌数が10個以下と少ない事から、食品からの迅速かつ正確な赤痢菌検出は食の安全上非常に重要である。そこで、本研究では、食品からの赤痢菌検出法の標準化を図り、感度の向上を目指した。2001年に西日本で韓国産輸入カキが原因の細菌性赤痢感染症患者が発生し、厚生労働省により参考試験法が配布されているが、本年度は、この参考法に変更を加え、高感度で迅速な方法に改良した。具体的には、再現性のあるサンプル処理方法、リアルタイムPCRの導入、不純物を除去する迅速かつ簡便な方法の導入により、1個以上の菌数がサンプルに存在すれば24時間以内に検出が可能である方法に改良した。本方法の実用性についての検討が今後必要である。

分担研究者

渡辺治雄 国立感染症研究所 副所長

岡部信彦 国立感染症研究所感染症
情報センターセンター長

相楽裕子 横浜市立市民病院 感染症部長

牧野壮一 国立大学法人帯広畜産大学
大動物特殊疾病研究センター長

因食品が残存しないため検査できないことや、食品中の原因菌量が少ないため検出が困難なことが一因である。2類感染症とその原因食品の情報を収集し、リスクファクターを解析するための方法や体制を構築することを目指す。

A. 研究目的

腸チフス・パラチフスは、ヒトが感染源であり、ヒトからヒトへ直接または食品や水を介して感染する。胆道系の長期保菌者が重要な感染源であったが、稀となった。細菌性赤痢では、サルの間にも感染が見られ、輸入サルが感染源となった事例が知られている。コレラでは、病原菌はヒトであるが、海岸・河川周辺にコレラ菌が存在するために感染源となる可能性がある。輸入食品の抜き取り検査からコレラ菌が検出されたこともあり、汚染輸入食品が感染源となる可能性もある。また、腸チフス・パラチフス・赤痢においても、牡蠣等による事例が存在する。

我が国では、一部を除いて2類感染症は常在していないと考えられている。そのため、国内で感染した事例は輸入食品が原因と推定されるが、特定するのは困難である。それは、原

B. 研究方法

(1) 発生状況調査

2類感染症発生状況を2001年からの感染症発生動向調査をもとに解析した。コレラについては患者の記述疫学を行った。潜在的な危険因子についても解析した。①動向調査で把握した患者の追加情報収集、②報告した自治体に対し情報提供を依頼(症状の経過・喫食調査・環境調査等)、③食中毒事件結果詳細の閲覧(厚生労働省医薬食品局食品保健部監視安全課)、④自治体のWEBページ等に関連報道資料の閲覧を行った。

(2) 原因食品情報を、ホームページ、発表論文から収集した。本年度はCenter for Science in the Public Interest(<http://www.cspinet.org/>)及び、厚生労働省:食中毒・食品監視(<http://www.mhlw.go.jp/topics/syokuchu/index.html>)を主に検索した。

(3) 食材の検査

パイロット試験として食材を検査した。検査項目としては、一般生菌数、大腸菌群、腸管出血性大腸菌O157、黄色ブドウ球菌(コアグララーゼ陽性)・サルモネラ属菌・カンピロバクター・クロストリジウム属菌を対象として、食品検査指針に従って行った。

(4) 腸チフス・パラチフスの事例調査

腸チフス・パラチフス患者から分離されたチフス菌・パラチフス A 菌は地方衛生研究所を通じて国立感染症研究所細菌第一部に送付される。これらの菌株が送付される際には、患者情報、症状、海外渡航歴などが菌株送付書として添付されている。それから渡航歴のない事例はさらに管轄保健所に問い合わせ、患者の行動記録をもとに腸チフス・パラチフスの感染に食品の関与を疑うかどうかを調べる。その結果、疑いがあればその菌株のフェージ型、パルスフィールド電気泳動を行い菌株の解析を行う。

(5) 国内事例(赤痢とコレラ)

2000年1月から2004年12月までの5年間に感染性腸炎研究会に属する東京都及び13政令指定都市の感染症指定医療機関に入院した細菌性赤痢とコレラの国内事例について発生状況を調査し、一部の事例ではretrospectiveに推定原因調査を行った。

(6) 食材からの赤痢菌分離法の検討

輸入カキが原因の細菌性赤痢感染症が発生した際、2001年に厚生労働省が各都道府県に配布した参考試験法に若干の変更を加えた方法を新規検出法とし、食品からの赤痢菌検出を試みた。

1. 使用菌株および培地

当研究室の保管株である *Shigella flexneri* YSH6000、*S. sonnei* を Trypticase-Soy Broth (TSB, Becton Dickinson)にて一晚培養し、滅菌済み生理

食塩水で希釈して使用した。組換え Rpf の作製には腸管出血性大腸菌 O-157 の集団食中毒事例株(堺株)由来のゲノム DNA を用いた。

2. 赤痢菌検出法

図1に本研究で用いた検出法と厚生労働省配布の参考試験法の相違点を示す。試験品として市販のカキ 25 g を使用した。滅菌済みのストマッカーバッグに試験品と 0.5 µg/ml ノボビオシン (DIFCO) と Tween 80 (関東化学) を 0.75 ml 添加したシゲラブロス (OXOID) 225 ml を入れ、ストマッカー (AES Labotoire) により 30 秒間ストマッキングした。そこに、 10^3 、 10^5 、 10^7 、 10^8 倍にそれぞれ希釈した菌液を加えて密閉し、ガスを逃す穴を数箇所開け、44°C で一晚培養した。陰性対照には菌を添加しなかった。

培養菌液 2 ml から MORA-EXTRACT DNA 抽出キット(極東製薬)を用いて添付の説明書に従い、ゲノム DNA を抽出した。赤痢菌および腸管侵入性大腸菌病原因子遺伝子の検出用プライマーとして *invG*、*ipaH*、16S rDNA (タカラバイオ) を使用し、ライトサイクラー (Roche) にてリアルタイム PCR を行った。PCR の条件を Table 1 に示す。反応終了後に 1% アガロースゲルにて電気泳動を行い、PCR 産物のサイズを確認した。

3. 一般細菌数

試験品と 9 倍量の滅菌済み phosphate-buffered saline (PBS) をストマッカーバッグに入れ 30 秒間ストマッキングした。原液および 10^2 、 10^3 倍に希釈した物を desoxycholate hydrogen sulfide lactose agar (DHL, 栄研) と Trypticase soy agar (TSA), 各 3 枚に 100 µl 塗抹後、好気条件下にて 37°C で一晚培養し、コロニー数を計測した。

(7) コレラ菌の PCR

1. 菌株および培地:

本研究には、*Vibrio cholerae* O1 Inaba株、*V. cholerae* O139Bengal株を標準株として供した。特に記載のない限り、培養にはトリプトソイブロス (Becton Dickinson) を用いた。

2. 食品からの *V. cholerae* 検出法に関する検討：

食品からのコレラ菌検出法については、平成14年10月21日付食監発第1021005号「魚介類等の食品からのコレラ菌の検出方法について」の別添に定める試験検査法に従って行った。その概要を以下に記す。

1 増菌培養

(1) 一次増菌培養：検体25gを無菌的に取り出し、225 mlのアルカリペプトン水 (pH8.6, 1%NaCl) を加え、35~37°Cで18±2時間静置培養したものを一次増菌培養液とした。

(2) 二次増菌培養：一次増菌培養液の上層から1 mlを採取し、よく混和後、その0.5 mlを10 mlのアルカリ性ペプトン水 (pH 8.6, 0% NaCl) に接種し、35~37°Cで8±2時間静置培養したものを二次増菌培養液とした。

3) PCR法

①DNA抽出：(1) で採取した一次増菌培養液 50 µl に、TE buffer(1 mM EDTA加 10 mM Tris-HCl, pH8.0) 450 µl を加え、100°Cで10分間加熱後、氷冷したものをDNA溶液とした。

②PCR反応：別紙の条件1によりPCRを行い、コレラ菌毒素遺伝子を増幅する。

③電気泳動：1.5~3%アガロースゲルを用いて電気泳動を行い、臭化エチジウムによりDNAを染色後、UVトランスイルミネーター上で写真撮影を行い、バンドの有無を確認した。バンドが確認されない場合はコレラ菌陰性とした。

2 確認試験：

PCRの結果、コレラ毒素遺伝子 (*ctxA*) が検出された場合、次の確認試験を実施した。

(1) 分離培養：二次増菌培養液の1白金耳をTCBS寒天培地に画線分離し、35~37°Cで18±2時間培養した。

(2) 一次鑑別試験：定型的な黄色コロニーの発育が認められた場合、できるだけ多くの菌を釣菌し、O1及びO139抗血清を用いたスライド凝集試験を実施した。凝集を認めない場合にはコレラ菌陰性とし、凝集した場合にはそれらをTSA培地に接種し、35~37°Cで18±2時間純培養し、以下の確認試験を行った。

(3) 生化学性状試験：純培養した菌を用いて、ブドウ糖発酵試験及び乳糖又は白糖発酵試験、運動性試験、リジン脱炭酸試験、オルニチン脱炭酸試験、アルギニン加水分解試験、インドール反応、マンニット発酵試験、イノシット発酵試験、オキシダーゼ試験、0%耐塩性試験の各生化学性状試験を実施し、当該菌株が *V. cholerae* であることを確認した。

(4) PCR法：供試菌を超純水 50µl に浮遊したものを扱い、1の(2)に従ったPCR法によりコレラ菌関連遺伝子 (O1特異遺伝子、O139特異遺伝子、コレラ毒素遺伝子) の検出を行った。

3. 16s rDNA配列の決定：

生化学性状より *V. cholera* non-O1/ O139と同定された3菌株について、16s rDNA遺伝子配列を決定し、遺伝学的同定を試みた。当該遺伝子領域はPCR法により増幅し(3)、BigDye terminator ver.3.0で標識後、ABI310 sequence detection systemを用いて配列を決定した。各配列はBlast検索を行い、*V. cholerae* および類縁菌との相同性を確認した。

4. 遺伝学的同定：

16s-23s intergenic spacer regionの

検出を同領域特異プライマーセット（表1）を用いたPCR法により行った。

5. 血清型別：

*Vibrio cholerae*抗O血清を用いて凝集反応試験を行い、O抗原の同定を行った。

6. 食品添加回収試験：

*V. cholerae*添加回収試験に際しては、冷凍エビ（インドネシア産）25gを供した。PCRについては、通知法に準拠し、以下の点を検討した。

(1) 一次増菌培地：

アルカリペプトン水として、現在の基準として設定されているpH9.2, 1% NaClに加え、pH8.6, 1% NaCl, およびpH8.6, 0%NaClの計3種について増殖効率の面からPCRによるスクリーニングを行い、検出感度への影響について検討した。

(2) PCR条件設定に関する検討：

現行法で規定されているPCRスクリーニング検査の方法は、熱変性92°C, 1 min; アニーリング 55°C, 1 min; 伸長72°C, 1 min (35サイクル)であるが、サイクル数が一般的なものに比べ、多い。そこで、サイクル数を35, 30, 25, 20サイクルと変えたときの検出限界について検討し、十分な検出感度を満たすサイクル数の検討を行った。更に反応時間についても、現行の熱変性1分、アニーリング1分、伸長1分に加えて、各ステップ30秒もしくは変性30秒、アニーリング30秒、伸長1分の3種について検討を加えた。

(3) 内部標準の設定：

PCR検査の精度を検証するため、内部標準として、pBR322プラスミドとこれに特異的なプライマーを反応液に添加し、PCR反応を行った。

C. 研究結果と考察

(1) わが国で2005年に報告された腸チフス患者は49名(推定国内感染12名)、パラチフス18名(同3名)、コレラ43名(同9名)で、赤痢

患者数は1桁多く525名(同121名)であった。()内に示したように、年によって増減はあるが、かなりの割合が国内で感染したと推定される。原因食品はほとんどが不明である。2001年の牡蠣から赤痢菌が分離された事例が新しいところである。

1) 腸チフス・パラチフス

2004年と2005年の病原体が確定された腸チフス国内発生例は23例で、男性7例と女性16例であった。年齢は10歳未満～90歳以上に分布した。発症月に偏りはみられなかった。2事例4例が2次感染による家族例で、他は散发例であった。感染源の特定はなかった。パラチフスは2004年の3例のみが報告され、いずれも男性で、10代1例、40代2例であった。発症月はいずれも5月であった。1例は検査室における検体からの感染で、他2例は散发例で感染源の特定はなかった。

1999年に食品衛生法施行規則が改正され、病因物質の種別に2類感染症も追加されたが、腸チフス・パラチフスでは届けがなかった。

2) 赤痢

2005年に病原体が特定された国内発生例は121例で、全体の23%であった。国内例は生牡蠣の汚染が確認された2001年と2002年に36～38%と高かったが、その後は20%程度で推移している。菌種別ではソネ菌が7割～8割を占めている。赤痢は、他の2類感染症に比べ発生数が多いこともあってか、毎年食中毒事件として届けられている。飲食店関連の事例がほとんどであるが、原因食品が特定されたのは2001年～2002年にかけて全国で発生した韓国産輸入生牡蠣くらいである。その他は、2004年には機内食のサラダが疑われた事例と飲食店、2003年には飲食店、2002年には飲食店と調理実習の食事が

疑われた事例が報告されている。

備考欄の記述から、家族や友人との接触による2次感染は2001年18件、2002年 31件、2003年 12件、2004年 14件、2005年 10件と推定される。年齢分布は国内例では5-9歳と35-39歳が若干高いが、全年齢層になだらかに分布しているのに比べ、海外例では20代に明らかなピークがある。

3) コレラ

症例数が少ないこともあり、国内で感染したコレラ患者に関する記述疫学調査を行った。2000年1月1日から2006年2月28日までの間、日本国内の保健所へ届出のあったすべてのコレラ患者のうち、①発病日の少なくとも一週間以内に海外渡航歴がなく、②便検査で *V. cholerae* O1またはO139が検出され、かつコレラ毒素あるいはコレラ毒素産生遺伝子が同定されたことの両方に該当するものを対象とした。65例の症例報告(2000年1月～2006年2月)のうち、61例について症状等の経過を、56例について喫食情報を入手できた。また、1件の食中毒事件調査結果詳細が報告された。

(a) 性別・年齢

性別は、国内例が男:女 = 42:23 (男性で1.8倍)、輸入例*が90: 39 (男性で2.3倍)であった。年齢は国内例が中央値62歳(範囲:26-87)で86 %は50歳以上、輸入例が中央値42歳(範囲:19-75)であった。国内例で、年齢が高い傾向が見られる。

* ここで輸入例とは2002年1月から2005年に報告されたコレラ患者で、推定感染地域が国外である者とした。

(b) 危険因子の解析

a) 季節性

日本の夏季の高温及び高湿度環境が、食品中のコレラ菌の生存・増殖に寄与する可能性を探るため月別の発生数を調べた。国内発

生コレラの報告の7割は夏季に集中している。

b) 魚介類の生食

国内発生のコレラ症例の潜在的な曝露因子としては、魚介類の生食が考えられる。2/3の症例で、発病当日を含むおよそ4日間に喫食歴あった。特に夏季には、一般集団における魚介類の生食は、これよりもはるかに低い可能性がある。生の魚介類は、調理の際の汚染か、あるいはコレラ常在地域で水揚げされた等の理由により、コレラ菌に汚染された可能性がある。

c) 胃切除等

胃切除歴のある人は、コレラに罹患する危険性が高いとされているので、患者側の危険因子について解析した。15% の患者で胃切除歴があった。これは、一般人口における胃切除歴の頻度を胃がん患者の罹患数10.3万人/年程度(平成11年推計)から推定すると、明らかに高いと思われる。胃切除に伴う無酸症により、消化管のpHが上昇し、消化管内における病原性細菌が殺菌されないことが原因とされている。従って、H2拮抗薬等の制酸剤により同様の効果が起きる可能性があり、このことも解析する必要がある。

(c) 食中毒事例

食中毒発生状況や厚生労働省のホームページから、コレラが食中毒事件として届けられたのは2000年～2002年に合計4件であった。

食中毒事件調査結果詳細:某年8月3日、64歳男性に突然の水様下痢を認め、同9日、便よりコレラ菌を検出した。この男性は7月28日に、とある集会で配布された仕出し弁当を喫食していた。この仕出し弁当は、17家族計26名が喫食していた。このうち7名に、7月28日から8月6日の間に下痢を認めた。この7名のうち1名と、無症候であった1名の計2名

からコレラ菌 (*V. cholerae* O1 エルトール小川型) を検出した。これらの確定例総計3名は、当該仕出し弁当以外に接点がなく、仕出し弁当の喫食が発病の原因であると断定された。当該仕出し弁当には、生のマグロ、赤貝及びイカの他、エビのフライが含まれていた。しかし、原因として、具体的な品目は特定できなかった。

(2) Center for Science in the Public Interest が過去に起こった食品が原因とされる事例についてまとめている。2類感染症の原因食品として報告されているのは、主に生食に供される生鮮食品や加工品が挙げられている。大規模な集団発生を起こしたのは、メキシコ風味ディップ(クリーム状の食品、豆、サルサ、グアカモール、ナチョ・チーズ、サワークリーム)、パセリ(メキシコ産)、葉ネギ(中米産)、レタス(スペイン産)など農産物 (Produce) であった。サラダとして、加熱しないで生で食することが多いためと思われる。海産物では、牡蠣やエビ・カニ等の魚介類が報告されている。牡蠣については、赤痢・コレラ・腸チフスにも見られる。生野菜や果物を含むサラダ類、乳製品、鶏肉、香辛料もあげられている。コレラは圧倒的に海産物で、果物(サンドイッチ)・ココナッツミルクでも事例があった。腸チフスでは、乳製品・農産物・牡蠣による発生があった。喫食調査の際にはこれらの食品も念頭に置く必要があると思われる。

(3) 平成17年度は主に給食用食材316件の食材を検査した。陽性の結果は、大腸菌群26件、黄色ブドウ球菌3件、サルモネラ属菌5件、カンピロバクター12件、クロストリジウム属菌5件であった。大腸菌群は豚肉6件、生揚げ2件、豆腐8件、油揚げ4件、ベーコン4件、もやし1件、いか1件からの検出で、黄色ブドウ球菌は豚肉、油揚げ、鶏肉から、サルモネ

ラ属菌はすべて鶏肉から、カンピロバクターは鶏肉と豚肉から、クロストリジウム属菌はベーコンからの検出であった。

(4) 2005年1月から12月までに分離されたチフス菌・パラチフス A 菌32株のうち渡航歴のない事例は腸チフス8例であった。これらに関し管轄保健所に電話し患者の発症前の行動記録から食品が関与しているかどうかを検討した結果、食品の関与が疑われる事例はなかった。さらに過去7年間の菌株送付書を調査した結果2002年に2例食品の関与を疑う記述がある送付書が見つかったので、2例の菌株をファージ型別、パルスフィールド電気泳動で解析を行った。下記にそれら2つの事例の詳細を記す。

事例1

大阪府堺市衛生研究所より平成14年5月14日に腸チフス患者より分離した菌株を受領した。

菌株番号020028 I. Y. 15歳 男性 高専学生 海外渡航歴無し

発病年月日平成13年12月下旬、診定年月日平成14年1月12日

住所 和歌山県G市

スーパーチェーン店のA支店で牡蠣を購入し加熱して喫食した旨、管轄保健所より連絡があった。

事例2

菌株番号020029 M. K. 12歳 男性 中学生 渡航歴無し

発病年月日平成13年12月下旬、診定年月日平成14年2月28日

住所 大阪府S市

スーパーチェーン店のB支店で牡蠣を購入し加熱して喫食した旨、管轄保健所より連絡があった。

これら2名の患者は、発病前（平成13年12月上旬）にスーパーチェーン店のA支店とB支店（同じスーパーチェーンの異なる支店）で牡蠣（加熱調理用、宮城県産）を購入し水炊きなどにして食べたことが確認されている。1つの事例では患者自身が牡蠣を食べてから調子が悪くなったという話をしていたことが確認されている。2支店間の距離は直線距離で約90キロメートルであった。患者2人に交友関係はない。2名より分離された菌株のフェージ型はともに46型であった。PFGEの結果、2名より分離された菌株のBlnIの切断パターンは一致した。過去に分離された菌（関連無し）のBlnIの切断パターンと比較した結果、レーン12の菌株（フェージ型E1、渡航先タイ）の切断パターンなど非常に類似したパターンが見られた。

以上の結果から、過去5年間の渡航歴のない腸チフス・パラチフス事例の調査を行った結果2例の食品の関与が疑われる事例が見つかった。これら2つの事例はともに牡蠣の喫食歴があり、その内1事例では患者自身は牡蠣が感染源ではないかと疑っていた。2つの事例とも牡蠣は同じスーパーチェーン店で購入されており、仕入れ先が同じと考えられた。菌株の解析より2つの株は同じフェージ型46型、PFGEでのBlnI切断パターンは同じであった。46型はそれほど頻繁に分離されるフェージ型ではないため、おそらく2つは同一の菌株であると考えられる。

スーパーチェーンが一括して仕入れた牡蠣を関西地方のA支店、B支店で販売し、それを購入した患者が同じチフス菌に汚染された牡蠣を食べて腸チフスを発症したことが疑われる。しかしながら、牡蠣そのものからのチフス菌の分離がない限り、牡蠣が原因であるという確証はない。また、牡

蠣がチフス菌に汚染されていたとしたらもっと大きな集団事例となることが考えられ、わずか2人のみの発症では本当に牡蠣がチフス菌に汚染されていたかはわからない。しかしながら、患者自身が牡蠣の関与を疑ったため保健所の担当者が国立感染症研究所に連絡があった。40年ほど前には、広島などで牡蠣が原因で腸チフス・パラチフスの発生がみられていた。衛生環境が改善されてからは牡蠣による腸チフス・パラチフスの発生はほとんどなくなっている。

(5) 国内事例

1) 入院状況と検出血清型

細菌性赤痢の入院数は240、うち国内例は37（15.4%）、国内例の血清型は *S.dysenteriae* 1, *S.flexneri* 10, *S.boydii* 0, *S.sonnei* 24, 不明2であった。コレラの入院数は26、うち国内例は5（19.2%）、すべて血清型01でコレラ毒素産生性であり、生物型Eltor Ogawa 2, Eltor Inaba 3であった。

2) 年齢・性別

細菌性赤痢の入院総数240例では20代が圧倒的に多く、その多くは国外由来例であった。国内例37（15.4%）は全年齢層に分布し、20歳未満と60歳以上では国内例が半数を占めた。コレラの入院総数は26例で、20代と50代（各8例）に多く、国外由来例が多数を占めていた。国内例は若年層にはみられず、40代以上であった。総数では細菌性赤痢では女性が、コレラでは男性が多かったが、国内例では性別に差はみられなかった。

3) 原因が推定された国内事例

国内例のうち、細菌性赤痢6例、コレラ1例について飲食物との関連が疑われた。細菌性赤痢1例は家庭内二次感染が疑われた。赤痢菌の血清型は *S.flexneri* 1, *S.sonnei* 6であった。推定原因とされた飲食物は海

鮮井2, すし1, 刺し身 1, イクラ醤油漬け 1, ベトナム料理1であった。コレラの国内例1例では居酒屋での生鮮魚介類喫食が原因と推測された。いずれも外食であったが、保健所の調査では特定されていない。

(6) 赤痢菌の検出法

1. 新規検出法

新規検出法により、 10^8 倍希釈した菌液を接種したサンプルで PCR 後の電気泳動から、*invG*、*ipaH*、16S rDNA 3つのプライマーが検出された。即ち、理論上1個以下の菌数が存在していれば、検出が可能であると考えられる。又、冷凍カキから *Shigella sonnei* を検出した例を参考に、二段階培養法を生カキと冷凍カキで実施したところ、二段階培養法は冷凍カキに使用したほうが検出感度は良好であった。

2. 一般細菌数

本研究に使用したカキの一般細菌数は 2.0×10^3 /g であり、大腸菌数は 1.5×10^3 /g であった。無菌のヤングコーンに大腸菌を接種し検出感度を調査した例では、 1.2×10^5 CFU/g 接種サンプルから PCR 法にてバンドが検出されているが、カキは消化管に細菌叢があるとされ、無菌状態とは考え辛い。又、食材中の高いタンパク質濃度などにより検出感度が低いと考えられており、食材からの DNA 抽出に検討が求められていたが、新規検出法でジルコニアビーズ破碎法キットを使用した事により問題解決に至ったと思われる。よって、本検出法はこの一般細菌や大腸菌存在下においても殆ど検出に影響を受けず、高感度であると考えられる。

本研究では、食品からの赤痢菌の検出法を確立する事・赤痢菌の VBNC について知見を得る事を目的とした。細菌性赤痢感染症の原因食材と考えられるが、検出が困難とされてきたカキを試験品とし、厚生労働省配布の参考試験法を変法した物を新規

検出法とした。本試験法で *S. flexneri* を植菌し、菌検出を確認したところ 1.7×10^{-1} CFU/ml の菌数で検出が確認できた。

S. sonnei をカキに植菌し、厚生労働省配布の参考試験法にて検出感度を調査した他の研究結果によると、PCR 法で検出できた菌数は 3.4×10^2 CFU/g であった。この事から、新規検出法は計算上 1 個以上の菌数が存在していれば検出が可能であり、高感度であると考えられる。

VBNC は代謝活性や病原性を保っており、生きているにもかかわらず増殖しない細菌の状態の事である。VBNC 状態の細菌による食品の汚染は食中毒感染症を蔓延させる恐れがあるため、公衆衛生上潜在的に危険であり、VBNC の解明は食の安全上非常に重要であると考えられる。又、赤痢菌の発症菌数が少ない理由に VBNC 菌の存在も考えられる事から、赤痢菌の VBNC について今後の検討が必要であり、今回の高感度な検出法により VBNC 状態の赤痢菌の生態について明らかにすることが可能となるであろう。

(7) コレラ菌の検出法

1. 冷凍食品からの *V. cholerae* 検出状況：モニタリング期間中（平成16年7月3日～9月30日）に、冷凍エビ・イカ・ロブスターを含む冷凍食品計45検体を検査対象として、コレラ菌の汚染状況を把握する目的で検査を行った。その結果、PCRスクリーニング検査において、コントロールである01および0139株（308bp）に比べ、異なるサイズのバンド増幅を認める複数の検体が検出された（表1）。これらの擬陽性反応の原因を明らかにするため、当該検体より対象となる菌株の分離を行い、再度PCRスクリーニングを行ったところ、62-11291、62-11292、62-1227、62-1143の4株で擬陽性バンドが検出された（図1）。

2. 分離菌株の同定

生化学性状試験により、2株はいずれも *V. cholerae* の性状を有していたが、残りの2株については、(62-11291および62-11292株)はそれぞれ *Aeromonas hydrophila* gr. 1 及び *Enterobacter amnigenus* 2 と同定された。62-1227および62-1143株については、更に16s rDNA配列を明らかにしたが、*Vibrio* 属として同定された2菌株の同配列は何れも *V. cholerae* 及び *V. mimicus* と100% 相同な配列を有しており、本菌の分類には別の遺伝子をターゲットとする必要性が考えられた。

そこで、近年、16s-23s領域のDNA配列の相違からPCR法を用いて分類できると報告のあるプライマーセット(4)を用いてPCRを行いこれらの分類を行った結果、いずれも *V. cholerae* と同定された(図2)。血清型別の結果、これらナグビブリオ2菌株のO血清型は079、051であることが明らかとなった。

3. 病原遺伝子の保有状況：

これらナグビブリオ分離株の病原因子の保有状況を明らかにするため、PCR法により病原遺伝子の保有状況を調査したところ、2株はいずれも *tcp* および *hlyA* 遺伝子を保有していた。また、2分離株はいずれも血液寒天上でβ溶血を示した。

4. 毒素遺伝子プライマーセットにより増幅を認めたDNA断片の塩基配列

V. cholerae 2株は何れも陽性対照である01, 0139株とは異なるサイズの増幅バンドを認めたことから、増幅DNAの配列を決定した。その結果、増幅DNA断片はいずれも *ctxA* とは明らかに異なっており、毒素活性は有していないと考えられた。

5. 検出法についての検討

1) アルカリペプトン水によるPCR検出感度の変化
冷凍エビ25gに0, 1, 100CFUの *V. cholerae*

01を接種後、アルカリペプトン水(pH 9.2, 1% NaCl; pH 8.6, 1% NaCl; pH 8.6, 0% NaCl) 225mlを添加し、培養後、TEバッファーに懸濁した菌液を加熱し、鋳型としてPCRに供した。*V. cholerae* 01由来 *ctxA* 遺伝子の検出に際しては、pH 9.2, 1% NaClおよびpH 8.6, 1% NaClのペプトン水により両者は共に高感度な検出状況を示したが、pH 8.6, 0% NaClのペプトン水を用いた場合には、感度の低下が認められた(図3)。一方で、0139 Bengal株を用いた際には、pH 9.2, 1% NaClのペプトン水が最も感度が高く、pH 8.6, 1% NaClのペプトン水では若干感度が低下した(図4)。二次確認検査で使用するMultiplex PCR系においても、菌株による差異が認められた(図5および6)。以上の結果より、アルカリペプトン水の条件は *V. cholerae* の中でも血清型により至適条件が異なると推察された。

2) PCR条件

PCR反応条件について検討するため、サイクル数を現行の35サイクルに加えて、30、25、20サイクルとした場合の検出感度の変化を観察した。鋳型DNAについては、約 10^7 CFU/mlの *V. cholerae* 01 Inaba, 0139 Bengal, 01 *ctxA*(-)菌液各1μlを用いた。当該菌数でのPCR反応においては35サイクルのみならず、30および25サイクルでも同等の増幅が認められた(図7)。検出限界について評価するため、*V. cholerae* 0139菌液を 10^0 - 10^{-4} 希釈(約 10^0 - 10^4 CFU)し、PCRを行ったところ、35および30サイクルでは同等に 10^{-3} 希釈液(2.59×10^1 CFU)まで検出できたが、25サイクルでは感度の低下が認められ、検出限界は、 10^{-2} 希釈(約 10^2 CFU)であった(図8)。

また、同時に反応時間の検討を行った。*V. cholerae* 0139は条件1(現行法)では35サイクルおよび30サイクルでの変動は示さ

ず、10-3希釈段階まで検出できた。これを条件2の短縮プロトコールで実施したところ、同等に検出され、同等の検出感度を担保できることが示された (図9)。

考察

本研究では、通知検査法を用いた輸入冷凍食品のコレラ菌検査の段階で、擬陽性反応が出たことに端を発し、その原因を究明するとともに、検出法を改めて検証することを目的とした。コレラ症の原因食品としてはエビやイカなどが主体と考えられるが、実際に擬陽性対象食品として挙げられたのもこれに属する冷凍食材であった。*ctx*遺伝子は染色体に埋め込まれたファージ遺伝子であり、変換ファージは動物体内において他のコレラ菌へと伝達されることで毒素産生性を獲得することが知られている(2)。この現象は、自然界に広く分布するCtx陰性のナグビブリオもまた、毒素産生を獲得する可能性があるといえ、ナグビブリオによる食品汚染は、潜在的な感染源ともなりうる。実際に、本研究において分離された2株のナグビブリオはいずれもコレラ毒素非産生であったが、*ctx*ファージの受容体である*tcp*遺伝子を保有していた。Miyagiらは、大阪湾の海水中より検出されたナグビブリオも高い割合で*tcp*遺伝子を有していることを報告しており(1)、環境分離株の高頻度な*tcp*遺伝子の保有は、新たな*ctx*獲得株の出現を招くと懸念される。また、毒素遺伝子はしばしばコレラ菌の検出法に使用されるが、そのほかの類似菌についても陽性を示すことが複数報告されている。本研究ではわが国における現行検査法について検討を行い、同様に*Aeromonas*や*Enterococcus*属菌で擬陽性反応を示しうることを明らかにした。また、ナグビブリオ2株についても陽性対照に比べて低分子のバンドが検出されており、PCR条件を再

考する必要性が考えられた。

実際に、PCR反応条件を検討し、サイクル数を低減して、その検出感度および精度を保てる基礎データを得た。すなわち、30サイクル反応系では35サイクルの場合と同等に対象遺伝子群の検出を行い得た。更に、反応時間の短縮によっても、本検出系は感度は同等に保たれており、*ctxA*擬陽性反応も30サイクルにPCRサイクル数を低減することにより、消失した。現行反応系では、約105分の時間を要するが、短縮プロトコールについては約60分で終了する。食品検査については多検体であることに加え、食品という特性上、迅速な検査が求められる。したがって、本法の適用は、同等の感度を担保しつつ、より迅速な検査を行う上で有用と考えられる。

食品からの当該菌検出を行うに当たっては、しばしば食品マテリアルによる干渉を受け、検出が困難となることも多い。その原因の一つとしては、生きているが培養できない、いわゆるVBNC (Viable But Non-Culturable) 状態に移行することが近年指摘されており、潜在的な感染病原体として、食品を介した感染に関与している可能性も考えられる。今後は、このVBNC状態を実験的に作出し、生体への病原性評価ならびに遺伝学的手法による生理活性の検出を測定することで、食品の安全性を図る上でのVBNC菌の重要性を明らかにする必要があると思われる。

E. 結論

(1)2類感染症発生状況を2001年からの感染症発生動向調査をもとに解析した。2類感染症はほとんどが海外感染であるが、いまだに国内感染が発生し減少傾向にない。赤痢に関しては2割程度、100例近くが毎年報告されている現状である。また、コレラ患者についての詳細な記述疫学の結果、患者側にも、魚

介類の生食や胃切除歴等、潜在的な危険因子が推定された。現状の体制では解析疫学を行うには困難が伴う。例えば、自治体が行っている疫学調査の内容は異なり、聴取していない内容について、危険因子として挙げる事ができない。危険因子について関連性指標の定量化(オッズ比など)が行われていないことが挙げられる。将来の国内発生の予防のために、これらの項目に加え制酸剤服用などを入れた、より精細な体制を構築し調査を継続する必要がある。

(2)原因食品情報を、ホームページ、発表論文から収集した。原因食品は、予想されるように、生食に供される生鮮食品や加工品が多い。一方、大規模な集団発生を起こしたのは、パセリ、葉ネギ、レタスなど農産物であった。海産物では、牡蠣やエビ・カニ等が、乳製品、鶏肉、香辛料もあげられている。喫食調査の際にはこれらの食品も念頭に置いて、調査票を検討する必要がある。

(3)パイロット試験として食材を検査した。2類感染症の原因物質(細菌)と性状がよく似ている菌が頻繁に分離されている。2類感染症が常在している地域からの輸入食品に関する監視体制を構築する必要があると思われる。

(4)海外渡航歴のない腸チフス・パラチフスはほとんどの場合感染源が全くわからない。非常に稀ではあるが、このように食品を介した事例も考えられるため今後海外渡航歴のない腸チフス・パラチフスについては調査の必要があると思われる。また、食品が関与しているかどうかを調査するには専ら患者の記憶に頼るしかないため患者からの聞き取り調査や喫食調査を慎重に行う必要があると考えられる。

(5)細菌性赤痢、コレラともに国外由来例が圧倒的に多く、国内例は前者で10数%、

後者で20%弱であった。細菌性赤痢の場合には家庭内や集団生活内の二次感染があるため、国内例のどこまでが飲食物由来なのか分からないが、コレラの場合は二次感染がほとんどないため、国内例はほぼ飲食物由来と推定される。原因が推測された事例では細菌性赤痢もコレラも外食した生鮮魚介類の関与が疑われた。

今後は国内例の喫食調査を徹底することによりリスクアセスメントを行うことが適切と思われる。

(6) 赤痢菌の検出法

赤痢菌は、発症菌数が10個以下と少ない事から、食品からの迅速かつ正確な赤痢菌検出は食の安全上非常に重要であるが、本研究で示した新規検査法により、1個以上の菌数が存在していれば検出が可能となった。

(7) コレラ菌の検出法

1) 輸入冷凍エビ・イカからPCRスクリーニング検査で *ctxA* 擬陽性と思われる反応が認められ、ナグビブリオ2株、*Aeromonas* および *Enterococcus* 属菌各1株が当該検出菌として分離された。

2) 擬陽性反応が出たことを受け、PCR条件について検証した結果、当該増幅バンドは毒素遺伝子ではなく、サイクル数および反応時間の短縮により消失することを明らかにした。

3) スクリーニング検査の感度・精度について検証を行い、①一次培養に用いるアルカリペプトン水について、*V. cholerae* 01の検出感度はpH 9.2, 1% NaClおよびpH 8.6, 1% NaClで同等であった。② *V. cholerae* 0139の検出に際しては、pH 9.2, 1% NaClの条件が至適であった。③PCRサイクル数については、30サイクルで35サイクルと同等の感度が保たれた。④反応時間については、熱変性ならびにアニーリング時間を半減しても感度は同等であったことか

ら、短縮プロトコールとして有用と考えられた。

F. 健康危機情報

なし

G. 発表業績

1. 論文発表

廣瀬健二

腸チフスパラチフスの対策について

日本医事新報 4235号94-95, 2005年 日

本医事新報社

廣瀬健二 伊藤健一郎 渡辺治雄

チフス菌・パラチフスA菌

日本臨床 63巻増刊7号187-190 2005

日本臨床社

Shuko Monden, Sou-ichi Makino, Keiko Kawamoto. Detection Method of *Shigella* from oyster by PCR. The Asian Conference on Diarrhoeal Diseases and Nutrition (ASCODD), March, 2006.

2 学会発表

日本国内で分離されたチフス菌・パラチフ

スA菌の薬剤感受性の傾向

廣瀬健二、渡辺治雄、相楽裕子

感染性腸炎研究会総会、東京、2005

腸チフスパラチフスの治療に関する調査20

00から2003年

相楽裕子 廣瀬健二 渡辺治雄

感染性腸炎研究会総会、東京、2005

ナリジクス酸耐性チフス菌・パラチフスA

菌の日本国内における分離状況

廣瀬健二 田村和満 泉谷秀昌 高井信子

渡辺治雄

第79回日本感染症学会総会 名古屋、20

05. 4. 14-15

腸チフスパラチフスの治療に関する調査20
00から2003年

相楽裕子 大西健児 角田隆文 今村顕史

小花光夫 大羽健一 廣瀬健二 渡辺治

雄

第79回日本感染症学会総会 名古屋、20

05. 4. 14-15

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

平成17年度 厚生労働科学研究費補助金・新興再興感染症研究事業
(研究課題名:食品由来の2類感染症のリスクアセスメントモデル構築に関する研究)

分担研究課題「2類感染症の発生状況とリスクファクターに関する研究」

分担研究者 岡部信彦 国立感染症研究所感染症情報センター センター長
研究協力者 伊藤健一郎・多田有希・山下和予・松野重夫・太田正樹・小林幹子・森山和郎・
飯田真里子 国立感染症研究所 感染症情報センター
松崎充宏 海事検定協会 食中毒担当

研究要旨

我が国では、一部を除いて2類感染症は常在していないと考えられている。そのため、国内で感染したと思われる事例は輸入食品が原因と推定されるが、特定するのは困難である。2類感染症とその原因食品の情報を収集し、リスクファクターを解析する。

本年度は、(1)2類感染症発生状況を2001年からの感染症発生動向調査をもとに解析した。いまだに国内発生があり、赤痢では2割程度、100例近くが毎年報告されている。また、コレラ患者の詳細な記述疫学から、患者側にも魚介類の生食や胃切除歴等、潜在的な危険因子が推定された。現行法では解析疫学を行うには困難が伴うため、より精細な調査法を検討する必要がある。(2)原因食品情報を、ホームページ、発表論文から収集した。原因食品は、生食に供される食品が多い。大規模な集団発生を起こしたのは、パセリ、葉ネギ、レタスなど農産物であった。喫食調査の際にはこれらの食品も念頭に置いて、調査票を作成する必要があると思われる。(3)パイロット試験として食材を検査した。2類感染症の原因物質(細菌)と性状がよく似ている菌が分離された。2類感染症常在地域からの輸入食品について監視が必要と思われる。

A. 研究目的

腸チフス・パラチフスは、ヒトが感染源であり、ヒトからヒトへ直接または食品や水を介して感染する。胆道系の長期保菌者が重要な感染源であったが、稀となった。細菌性赤痢では、サルの間にも感染が見られ、輸入サルが感染源となった事例が知られている。コレラでは、病原巣はヒトであるが、海岸・河川周辺にコレラ菌が存在するために感染源となる可能性がある。輸入食品の抜き取り検査からコレラ菌が検出されたこともあり、汚染輸入食品が感染源となる可能性もある。また、腸チフス・パラチフス・赤痢においても、牡蠣等による事例が存在する。

我が国では、一部を除いて2類感染症は常在していないと考えられている。そのため、国内で感染した事例は輸入食品が原因と推定されるが、特定するのは困難である。それは、原因食品が残存しないため検査できないことや、食品中の原因菌量が少ないため検出が困難なことが一因である。2類感染症とその原因食品の情報を収集し、リスクファクターを解析するための方法や体制を構築することを旨とする。

B. 研究方法

(1)2類感染症発生状況を2001年からの感染症発生動向調査をもとに解析した。コレラについては患者の記述疫学を行った。潜在

的な危険因子についても解析した。①動向調査で把握した患者の追加情報収集、②報告した自治体に対し情報提供を依頼(症状の経過・喫食調査・環境調査等)、③食中毒事件結果詳報の閲覧(厚生労働省医薬食品局食品保健部監視安全課)、④自治体のWEB ページ等で関連報道資料の閲覧を行った。

(2)原因食品情報を、ホームページ、発表論文から収集した。本年度は Center for Science in the Public Interest (<http://www.cspinet.org/>) 及び、厚生労働省：食中毒・食品監視 <http://www.mhlw.go.jp/topics/syokuchu/index.html> を主に検索した。

(3)パイロット試験として食材を検査した。検査項目としては、一般生菌数、大腸菌群、腸管出血性大腸菌 O157、黄色ブドウ球菌(コアグラージェ陽性)・サルモネラ属菌・カンピロバクター・クロストリジウム属菌を対象として、食品検査指針に従って行った。

C 結果と考察

(1)わが国で2005年に報告された腸チフス患者は49名(推定国内感染12名)、パラチフス18名(同3名)、コレラ43名(同9名)で、赤痢患者数は1桁多く525名(同121名)であった(表1-表3)。()内に示したように、年によって増減はあるが、かなりの割合が国内で感染したと推定される。原因食品はほとんどが不明である。2001年の牡蠣から赤痢菌が分離された事例が新しいところである。

1) 腸チフス・パラチフス

2004年と2005年の病原体が確定された腸チフス国内発生例は23例で、男性7例と女性16例であった。年齢は10歳未満～90歳以上に分布した。発症月に偏りはみられなかった。2事例4例が2次感染による家族例で、他は散发例であった。感染源の特定

はなかった。パラチフスは2004年の3例のみ(表中の2005年国内3例はいずれも疑似症)が報告され、いずれも男性で、10代1例、40代2例であった。発症月はいずれも5月であった。1例は検査室における検体からの感染で、他2例は散发例で感染源の特定はなかった。

1999年に食品衛生法施行規則が改正され、病因物質の種別に2類感染症も追加されたが、腸チフス・パラチフスでは届けがなかった(表4)。

2) 赤痢

2005年に病原体が特定された国内発生例は121例で、全体の23%であった。国内例は生牡蠣の汚染が確認された2001年と2002年に36～38%と高かったが、その後は20%程度で推移している(表2)。菌種別ではソルネ菌が7割～8割を占めている(表5)。赤痢は、他の2類感染症に比べ発生数が多いこともあってか、毎年食中毒事件として届けられている。飲食店関連の事例がほとんどであるが、原因食品が特定されたのは2001年～2002年にかけて全国で発生した韓国産輸入生牡蠣くらいである。その他は、2004年には機内食のサラダが疑われた事例と飲食店、2003年には飲食店、2002年には飲食店と調理実習の食事が疑われた事例が報告されている。

備考欄の記述から、家族や友人との接触による2次感染は2001年18件、2002年31件、2003年12件、2004年14件、2005年10件と推定される。年齢分布は国内例では5-9歳と35-39歳が若干高いが、全年齢層になだらかに分布(図1)しているのに比べ、海外例では20代に明らかなピークがある(図2)。

3) コレラ

症例数が少ないこともあり、国内で感染したコレラ患者に関する記述疫学調査を行っ

た。

2000年1月1日から2006年2月28日までの間、日本国内の保健所へ届出のあったすべてのコレラ患者のうち、①発病日の少なくとも一週間以内に海外渡航歴がなく、②便検査で *V. cholerae* O1 または O139 が検出され、かつコレラ毒素あるいはコレラ毒素産生遺伝子が同定されたことの両方に該当するものを対象とした。65例の症例報告(2000年1月～2006年2月)のうち、61例について症状等の経過を、56例について喫食情報を入手できた。また、1件の食中毒事件調査結果詳報が報告された。

(a)性別・年齢

性別は、国内例が男:女 = 42:23 (男性で1.8倍)、輸入例*が90:39 (男性で2.3倍)であった。年齢は国内例が中央値62歳(範囲:26-87)で86%は50歳以上、輸入例が中央値42歳(範囲:19-75)であった。国内例で、年齢が高い傾向が見られる。

*ここで輸入例とは2002年1月から2005年に報告されたコレラ患者で、推定感染地域が国外である者とした。

(b)危険因子の解析

a) 季節性

日本の夏季の高温及び高湿度環境が、食品中のコレラ菌の生存・増殖に寄与する可能性を探るため月別の発生数を調べた(表6)。国内発生コレラの報告の7割は夏季に集中している。

b) 魚介類の生食

国内発生のコレラ症例の潜在的な曝露因子としては、魚介類の生食が考えられる。2/3の症例で、発病当日を含むおよそ4日間に喫食歴あった(表7)。特に夏季には、一般集団における魚介類の生食は、これよりもはるかに低い可能性がある。生の魚介類は、調理の際の汚染か、あるいはコレラ常在地域で水揚げされた等の理由により、コレラ菌

に汚染された可能性がある。

c) 胃切除等

胃切除歴のある人は、コレラに罹患する危険性が高いとされているので、患者側の危険因子について解析した(表8)。15%の患者で胃切除歴があった。これは、一般人口における胃切除歴の頻度を胃がん患者の罹患数10.3万人/年程度(平成11年推計)から推定すると、明らかに高いと思われる。胃切除に伴う無酸症により、消化管のpHが上昇し、消化管内における病原性細菌が殺菌されないことが原因とされている。従って、H2拮抗薬等の制酸剤により同様の効果が起きる可能性があり、このことも解析する必要がある。

(c) 食中毒事例

食中毒発生状況や厚生労働省のホームページから、コレラが食中毒事件として届けられたのは2000年～2002年に合計4件であった。

食中毒事件調査結果詳報:某年8月3日、64歳男性に突然の水様下痢を認め、同9日、便よりコレラ菌を検出した。この男性は7月28日に、とある集会で配布された仕出し弁当を喫食していた。この仕出し弁当は、17家族計26名が喫食していた。このうち7名に、7月28日から8月6日の間に下痢を認めた。この7名のうち1名と、無症候であった1名の計2名からコレラ菌(*V. cholerae* O1 エルトール小川型)を検出した。これらの確定例総計3名は、当該仕出し弁当以外に接点がなく、仕出し弁当の喫食が発病の原因であると断定された。当該仕出し弁当には、生のマグロ、赤貝及びイカの他、エビのフライが含まれていた。しかし、原因として、具体的な品目は特定できなかった。

(2) Center for Science in the Public Interest が過去に起こった食品が原因とされる事例についてまとめている(表10)。2類感染症の

原因食品として報告されているのは、主に生食に供される生鮮食品や加工品が挙げられている。大規模な集団発生を起こしたのは、メキシコ風味ディップ(クリーム状の食品、豆、サルサ、グアカモール、ナチョ・チーズ、サーワークリーム)、パセリ(メキシコ産)、葉ネギ(中米産)、レタス(スペイン産)など農産物(Produce)であった。サラダとして、加熱しないで生で食することが多いためと思われる。海産物では、牡蠣やエビ・カニ等の魚介類が報告されている。牡蠣については、赤痢・コレラ・腸チフスにも見られる。生野菜や果物を含むサラダ類、乳製品、鶏肉、香辛料もあげられている。コレラは圧倒的に海産物で、果物(サンドイッチ)・ココナッツミルクでも事例があった。腸チフスでは、乳製品・農産物・牡蠣による発生があった。喫食調査の際にはこれらの食品も念頭に置く必要があると思われる。

(3)平成17年度は主に給食用食材316件の食材を検査した。陽性の結果は、大腸菌群26件、黄色ブドウ球菌3件、サルモネラ属菌5件、カンピロバクター12件、クロストリジウム属菌5件であった。大腸菌群は豚肉6件、生揚げ2件、豆腐8件、油揚げ4件、ベーコン4件、もやし1件、いか1件からの検出で、黄色ブドウ球菌は豚肉、油揚げ、鶏肉から、サルモネラ属菌はすべて鶏肉から、カンピロバクターは鶏肉と豚肉から、クロストリジウム属菌はベーコンからの検出であった。

D. 謝辞: 今回の調査に多大な協力をいただいた都府県及び政令市(中核市、保健所設置市を含む)の衛生部局の皆様をはじめ、Dr. JM Kobayashi (Washington 大学)、厚生労働省医薬食品局食品保健部監視安全課、国立感染症研究所感染症情報センター大山主任研究官、細菌第一部荒川主任研究官に感謝します。

E. 結論

(1)2類感染症発生状況を2001年からの感染症発生動向調査をもとに解析した。2類感染症はほとんどが海外感染であるが、いまだに国内感染が発生し減少傾向にない。赤痢に関しては2割程度、100例近くが毎年報告されている現状である。また、コレラ患者についての詳細な記述疫学の結果、患者側にも、魚介類の生食や胃切除歴等、潜在的な危険因子が推定された。現状の体制では解析疫学を行うには困難が伴う。例えば、自治体が行っている疫学調査の内容は異なり、聴取していない内容について、危険因子として挙げるできない。危険因子について関連性指標の定量化(オッズ比など)が行われていないことが挙げられる。将来の国内発生の予防のために、これらの項目に加え制酸剤服用などを入れた、より精細な体制を構築し調査を継続する必要がある。

(2)原因食品情報を、ホームページ、発表論文から収集した。原因食品は、予想されるように、生食に供される生鮮食品や加工品が多い。一方、大規模な集団発生を起こしたのは、パセリ、葉ネギ、レタスなど農産物であった。海産物では、牡蠣やエビ・カニ等が、乳製品、鶏肉、香辛料もあげられている。喫食調査の際にはこれらの食品も念頭に置いて、調査票を検討する必要がある。

(3)パイロット試験として食材を検査した。2類感染症の原因物質(細菌)と性状がよく似ている菌が頻繁に分離されている。2類感染症が常在している地域からの輸入食品に関する監視体制を構築する必要があると思われる。

F. 発表業績

1. 発表論文 なし
2. 学会発表 なし

G. 知的所有権取得状況 なし

表1. 腸チフス・パラチフスの年次別・推定感染地域別報告数(疑似症を含む)

| 診断年 | 腸チフス | | | | パラチフス | | | |
|------|------|----|----|----|-------|----|----|----|
| | 国内 | 海外 | 不明 | 合計 | 国内 | 海外 | 不明 | 合計 |
| 2001 | 8 | 53 | 4 | 65 | 2 | 20 | 0 | 22 |
| 2002 | 14 | 40 | 9 | 63 | 0 | 31 | 4 | 35 |
| 2003 | 8 | 48 | 6 | 62 | 2 | 40 | 2 | 44 |
| 2004 | 11 | 57 | 3 | 71 | 3 | 86 | 2 | 91 |
| 2005 | 12 | 33 | 4 | 49 | 3 | 14 | 1 | 18 |

IDWR 2006年第10週号

表2. 赤痢の年次別・推定感染地域別報告数(疑似症を含む)

| 診断年 | 国内 | 海外 | 不明 | 合計 |
|------|-----|-----|----|-----|
| 2001 | 314 | 498 | 39 | 851 |
| 2002 | 265 | 378 | 51 | 694 |
| 2003 | 127 | 328 | 19 | 474 |
| 2004 | 91 | 475 | 16 | 582 |
| 2005 | 121 | 394 | 10 | 525 |

感染症発生動向調査 2005. 12. 6 現在

表3. コレラの年次別・推定感染地域別報告数(疑似症を含む)

| 診断年 | 国内 | 海外 | 不明 | 合計 |
|------|----|----|----|----|
| 2001 | 10 | 25 | 0 | 35 |
| 2002 | 16 | 16 | 2 | 37 |
| 2003 | 2 | 13 | 0 | 15 |
| 2004 | 10 | 67 | 1 | 78 |
| 2005 | 9 | 33 | 1 | 43 |

病原微生物検出情報 27(1)

表4. 食中毒事件

| 年 | コレラ | 赤痢 | 腸チフス | パラチフス |
|------|-------|--------|------|-------|
| 2000 | 1(2) | 1(103) | 0 | 0 |
| 2001 | 1(7) | 3(13) | 0 | 0 |
| 2002 | 2(10) | 2(36) | 0 | 0 |
| 2003 | 0 | 1(10) | 0 | 0 |
| 2004 | 0 | 2(31) | 0 | 0 |

厚生労働省食中毒・食品監視関連情報、食中毒発生状況

表5. 赤痢の型別(疑似症を除く)

| 年 | ボイド | 志賀 | フレキシネル | ソンネ | 合計 |
|------|-------|-------|---------|----------|----------|
| 2001 | 10(0) | 7(0) | 134(41) | 600(235) | 751(276) |
| 2002 | 21(4) | 9(1) | 132(51) | 463(185) | 625(241) |
| 2003 | 20(4) | 12(0) | 92(33) | 312(76) | 436(113) |
| 2004 | 12(0) | 8(1) | 101(27) | 431(56) | 552(84) |
| 2005 | 13(3) | 3(0) | 80(15) | 403(92) | 499(110) |

感染症発生動向調査 2005. 12. 6 現在

() 内は国内発生例