

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18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19(2007)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----- 13
分担研究者 岡部信彦、相楽裕子
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、飯田真里子
森屋一雄、中山 宏、長山澄彦、九州・山口地区19自治体感染症担当者
松崎充宏

2. 食品における赤痢菌検出法の標準化と感度の向上----- 25
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

3. 食品からのコレラ菌検出法に関する検討----- 29
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

4. 海外渡航者由来のコレラ菌分離株の疫学解析に関する研究----- 47
分担研究者 泉谷秀昌
研究協力者 荒川英二、森田昌知、三戸部治郎、西村聖美、竹内真人、岡村徳子

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

主任研究者 山本茂貴 国立医薬品食品衛生研究所

研究要旨

2類感染症の国内感染事例における原因食品を推定するため、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感染症サーベイランスシステムにより解析した。また、原因食品情報を医学中央雑誌、病原微生物検出情報月報及び厚生労働省医薬食品局食品安全部監視安全課の食中毒発生状況から収集した。(2) 九州・山口地区での国内発生事例の積極調査、さらに(3) パイロット試験として食材の検査を継続した。

赤痢菌は、グラム陰性桿菌で細菌性赤痢の原因菌であり2類感染症の1つに指定されている。細菌性赤痢は海外で感染した後、国内に持ち込まれるいわゆる輸入感染症による事例が多かったが、近年では国内感染例が増加傾向にある。その原因は汚染食品の摂食による食品媒介感染と考えられており、発症菌数が10個以下と極めて少ないことから、食品からの迅速かつ正確な赤痢菌の検出法を確立することは、食品食の安全確保上非常に重要である。

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。食品中の赤痢菌の検出法については、2001年に西日本で韓国産輸入カキが原因で細菌性赤痢が発生したとき、厚生労働省により参考試験法が示された。初年度においては、この参考法に変更を加え、検出感度に優れかつ迅速に結果が得られる試験法を考案し、1個以上の赤痢菌が試料中に存在すれば、24時間以内に検出を可能とするシステムを構築した。今年度においては、海外産のカキについて本試験法の有用性を国内産を含めて確認したが、すべて陰性であった。しかし、赤痢菌のヒトに対する発症菌数は著しく低いという観点から、本菌が食品中でVBNCのように培養不可能な状態になる可能性について検討し、赤痢菌もある条件下でVBNCに移行することが確認された。

コレラ症の一因としては食品を介した感染経路が指摘されている。しかしながら、当該原因菌は複数の要因により食品からの検出に困難を来すことが多い。従って、当該検出法の精度・感度の向上は、本感染症のリスクアセスメントモデルを構築するにあたっての重要な課題といえる。前年度、通知検査法の中にあるPCRスクリーニング法で擬陽性反応が報告されたことを受け、本年度は同法における内部標準に関する検討を行い、より精度の高い反応系を確立した。また、コレラ菌の食品からの培養に際する至適条件に関する知見を得た。加えて、魚介類からのコレラ菌検出を目的としたMultiplexリアルタイムPCR法を構築し、少数の汚染菌数を定量的に把握できる検出系として、その有

用性を示した。

コレラは、コレラ菌（コレラ毒素産生性の *Vibrio cholerae* 01 もしくは 0139）によって生じる経口感染症であり、本菌に汚染された食品や水を介してヒトに感染する。コレラは現在 1961 年頃から始まった第 7 次世界的流行が現在も続いている状態であり、その原因はエルトル型 *V. cholerae* 01 である。我が国ではコレラは主としてアジアを中心とした海外渡航者による輸入例が大半を占めている。国内例の報告もあるが、そのほとんど全てが散发例ということもあり原因究明にいたることはほとんどない。こうした国内例の原因究明にあたり、現在の海外の流行菌株を把握することは非常に重要であると考えられる。本研究では主として海外渡航者由来のコレラ菌分離株に着目しこれらの特徴づけを行うべく、最近報告された国際的な統一手法となりつつあるパルスネット プロトコールによるコレラ菌のパルスフィールドゲル電気泳動法による解析を行った

分担研究者

岡部信彦 国立感染症研究所
泉谷秀昌 国立感染症研究所
相楽裕子 市立横浜病院
牧野壮一 帯広畜産大学

A. 研究目的

2 類感染症の国内感染事例における原因食品を推定するため、2 類感染症とその原因食品の情報を収集し、リスクアセスメントモデルを構築する。

B. 研究方法

1. 2 類感染症発生状況を感染症サーベイランスシステムにより解析した。また、原因食品情報を医学中央雑誌、病原微生物検出情報月報及び厚生労働省医薬食品局食品安全部監視安全課の食中毒発生状況から収集した。2. 九州・山口地区での国内発生事例の積極調査、さらに、3. パイロット試験として食材の検査を継続した。4. 赤痢菌について、検出感度に優れかつ迅速に結果が得られる試験法を考案し、1 個以上の赤痢菌が試料中に存在すれば、24 時間以

内に検出を可能とするシステムを構築した。

今年度においては、海外産のカキについて本試験法の有用性を国内産を含めて確認した。また、赤痢菌が生残しているが培養できない VBNC 状態になる可能性について検討した。5. コレラ菌の通知検査法の中にある PCR スクリーニング法で擬陽性反応が報告されたことを受け、本年度は同法における内部標準に関する検討を行い、より精度の高い反応系について検討した。また、コレラ菌の食品からの培養に際する至適条件について検討した。6. 海外渡航者由来のコレラ菌分離株に着目しこれらの特徴づけを行うべく、パルスネット プロトコールによるコレラ菌のパルスフィールドゲル電気泳動法による解析を行った。

C. 研究結果

1. 2 類感染症の発生状況

(1) 感染症サーベイランスシステムからの情報

わが国で 2006 年に報告された腸チフス患者は 62 名(推定国内感染 10 名)、パラチフス患者 25 名(同 1 名)、コレラ患者 39 名

(同 8 名)で、赤痢患者は 1 桁多く 488 名(同 105 名)であった。若干の増減はあるが、海外及び国内事例とも昨年までとほぼ同様な傾向であった。原因食品はほとんどが不明である。また、2007 年 1 月から 3 月 15 日までの報告数は、腸チフス 6 名(推定国内感染 2 名)、パラチフス 5 名(同 1 名)、コレラ 3 名(同 1 名)及び赤痢 102 名(同 13 名)であった。

感染症サーベイランスシステムは 2006 年 4 月から新システムに移行したため、それぞれの感染症についての解析は、2006 年 4 月から 2007 年 3 月までについて行った。旧システムについては 2006 年 1 月～3 月についてまとめたものを別欄に載せた。

1) 腸チフス・パラチフス

2006 年 4 月から 2007 年 3 月の間に報告された腸チフス国内発生例は、10 例で、男性 7 例と女性 3 例であった。年齢は 17 歳から 78 歳以上に分布した。78 歳と 61 歳の女性及び 30 歳の男性の計 3 名が無症状病原体保持者であった。発症月に偏りはみられなかった。78 歳の女性は 27 歳男性患者の祖母で、この 1 事例のみが家族例であった。感染源は特定できなかった。

パラチフスは 2 例のみで、22 歳の男性と 84 歳の女性であった。いずれも、散发例で感染源は特定されなかった。

2) 赤痢

2006 年 4 月から 2007 年 3 月の間に報告された赤痢国内発生例は、103 例(発生数の 21%)で、男性 52 例と女性 51 例とほぼ同数であった。表 7 に赤痢国内発生例一覧を示した。年齢は 1 歳から 98 歳まで分布した。9 例が無症状病原体保有者で、5 歳以下 2 名、20 代 4 名、40 代 1 名、50 代 2 名に

分布し、男性 6 名と女性 3 名であった。集団発生や患者家族の検査によって見つけれられるケースがほとんどである。発症月では、9 月と 10 月がそれぞれ 25 名と 24 名で、他の月の 2 名～8 名と比べ目立って多かった。9 月は家族内事例が 3 件と多く、さらに石川県におけるすし屋関連の集団事例によるもので、10 月は大阪府の保育園の集団事例と鈴鹿サーキットに関連する集団によるものであった。また、10 月には宮城と大阪と離れているが、2 事例で推定原因食にイカの塩辛や生食を挙げていたのが目を引いた。感染源特定はなかったが、備考欄には、前述したイカ以外に、白子、鶏ささみ、豚肉すき焼き、焼き肉、幕の内弁当などが記載されている。

菌種別ではソネ菌が 7 割～8 割を、フレキシネル菌が 2 割強を占めていて、例年と同様であった。国内事例はソネ菌の割合が 7 割と海外例の 8 割に比べ若干低かった。大きな集団事例は石川県の寿司屋と大阪府の保育園の 2 件あり、さらに、鈴鹿サーキットで飲食し 4 名が発病している。食中毒事例状況をまとめ結果では、赤痢は毎年 1 から 3 件が食中毒事件として届けられていたが、最新の 2005 年では 0 件となっている。この年は施設で集団事例が起こっているが食中毒としては報告されていない。食品衛生法施行規則が改正され、病因物質に赤痢菌が追加されてから、届け出がないのは初めてである。

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 8 件あった。2001 年 18 件、2002 年 31 件、2003 年 12 件、2004 年 14 件、2005 年 10 件と推移しているが、本年度も相変わらず多く注意が必要で

ある。年齢分布は、海外例では20代に明らかなピークがあり、一方国内例では61歳以上が若干多くなっているが、全年齢層になだらかに分布していた。これも例年と同じ傾向である。

3) コレラ

(1) 発生状況

2006年4月から2007年3月の間に報告されたコレラ国内事例は7例で、男性8例(2例は疑似症患者)と女性1例であった。年齢は31歳の疑似症患者の他は68歳以上で国内コレラ患者が高年齢者に多い傾向は変わらなかった。発症月は夏場をはさみ6月から11月の間に7件、1月に1件であった。2次感染を疑わせる事例はなかった。いずれも感染源は特定できなかった。

(2) 原因食品情報

医学中央雑誌でコレラ、腸チフス、パラチフスをキーワードに最近5年間(2001年から2006年)に邦文雑誌に掲載された報告を検索した。約450件がヒットした。そのうち、概要から原因食品について記述がありそうな論文を63篇選び出した。また、病原微生物検出情報についても最近5年間(2001年から2006年)の特集および特集関連記事や国内速報記事について検索した。病原微生物検出情報月報と厚生労働省医薬食品局食品安全部監視安全課の食中毒発生状況を検索した。これらをまとめて推定を含む原因食品について表を作成した。

食品から原因菌として赤痢菌が検出されたのは、2000年から2001年にかけて、全国で150名以上の感染者を出した韓国産牡蠣による1例だけであった。推定原因食品ではやはり魚介類が多く、マグロ・イカ、刺身、赤貝、輸入冷凍魚介類などがあげら

れている。サラダや漬物も多く、人参サラダ、韓国産キムチ、小カブの浅漬けなどがあげられている。また、従業者からの2次的な感染や手洗い水による感染、消毒不良による水道水の感染も報告されている。

2. 九州・山口地区における積極的疫学調査

赤痢を中心にコレラ、腸チフス・パラチフスの国内事例について九州・山口県の19自治体で積極的疫学調査を行った。標準喫食調査票と疑い食品一覧表の作成及び調査協力依頼用のパンフレットを作成した。埼玉県で行った「0157等感染症発生原因調査事業」で使用した喫食・行動調査票を参考にして作成した。感染研と九州・山口感染症対策プロジェクト事務局で1回の打合せをおこない、それを受けて九州・山口県内の全19自治体の感染症担当者と2回の会議を開き標準調査票の作成と調査の方法を練り、7月25日から調査を開始した。

九州・山口地区の赤痢国内事例は調査開始から5件(2006年で6件)あり、そのうち3件で標準調査票による調査が行われた。腸チフスは1件あったが、無症状病原体保有者で標準調査票による調査は行わなかった。同地区でのパラチフスとコレラの国内事例はなかった。標準調査票を使用できなかった2事例では時間不足により態勢準備ができなかったことが影響している。調査を通じて、(1)患者の居住地と医療機関の住所が異なっていた場合にどちらの自治体がイニシアチブをとるかあいまいである、(2)症状が軽い場合は医療機関でも見逃してしまう可能性があることが問題点として挙げられた。(1)については、厚生労働

省担当部局に問い合わせ、「医療機関の所在地の自治体が行う」ということが確認できた。(2)については、平成13年度厚生科学研究「生活安全総合研究事業」諸外国における食品媒介感染症に対する調査の研究の中で岩崎恵美子博士が指摘しているように「下痢症患者の治療を始める前に必ず下痢便調査を実施するという医師の割合は7%と少ない」こともあり、患者発生の全国または地域の情報を流すなどなんらかの啓発策が必要と思われる。

資料として、(1)赤痢・コレラ感染症発生原因調査票、(2)腸チフス・パラチフス感染症発生原因調査票、(3)細菌性赤痢・コレラ・腸チフス・パラチフス国内発生事における原因調査実施要領、(4)パンフレット、(5)細菌性赤痢・コレラ・腸チフス・パラチフス国内発生事における原因調査についての依頼文を載せた。

3. 食品の検査

平成18年度は18種類の市販生鮮野菜について合計103検体について行った。内訳は、なす(検体数4、以下同様)、白菜(2)、ねぎ(1)、キャベツ(22)、もやし(18)、小松菜(13)、きゅうり(12)、ピーマン(1)、玉ねぎ(2)、ほうれん草(3)、かぶ(4)、しめじ(3)、えのき(2)、大根(1)、人参(1)、さやいんげん(4)、にら(4)、アスパラガス(2)の計103検体である。

Klebsiella-Enterobacter 群が、ピーマン、玉ねぎ、えのきを除く他の15種類から検出された。きゅうり、小松菜、えのき、白菜、ほうれん草から *Citrobacter freundii* が、にら、キャベツ、小松菜、さやいんげんから *Escherichia coli* が検

出された。腸管出血性大腸菌 0157 については、103 検体すべて陰性であった。

4. 赤痢菌の新規検出法

(1) 赤痢菌検出

国内で赤痢菌の検出は困難であると考え、タイ国バンコク市内で市販されているエビ45検体およびカキ40検体の合計85検体を用い、新規に考案した方法にしたがって検査を行った。その結果、培養法においては赤痢菌陽集落は検出できなかった。そこで、PCRによる検出を試みたが、全て陰性であった。

(2) 赤痢菌のVBNCへの移行について

赤痢菌を3%、7%、13% NaCl 溶液に浮遊し、37°Cで静置培養を行った結果、7%および13% NaCl 溶液中では5日後にTSA上での集落形成が確認できなかった。一方、3%溶液中では6日後に集落が確認できなかった。また、顕微鏡にて観察すると、6日後において約40~50%の生存率であり、赤痢菌もVBNCに移行することが示された。

5. コレラ菌のPCRスクリーニング検査

(1) 内部標準の検討

前年度に報告したとおり、通知法におけるPCRスクリーニング検査段階で、擬陽性反応が報告され、内部標準が原因として推察されたことから、本年度はその見直しを行った。擬陽性の一因と目された、内部標準検出用にコントロールDNA及びプライマーの併用に着目し、*ctxA*プライマー配列を両端に保有する16sDNA断片のみを、反応液に添加することで改善を図った。

同内部標準遺伝子は *ctxA* プライマーを用いた現行反応系において、*ctxA* 遺伝子と

共に増幅された。その至適濃度について検討した結果、1 反応 (50 μ l) あたり 781pg 以上の添加により、*ctxA* 遺伝子の増幅は干渉されたが、1 反応あたり 50pg の添加 (1pg/ μ l) により、*ctxA* 遺伝子は無添加コントロール群と同等の検出感度を示した。

次に、検出感度・精度を確認するため、冷凍エビサンプル中にコレラ菌を添加し、加熱変性 DNA 抽出溶液を用いて PCR を行ったが、*ctxA* 遺伝子の検出感度は、無添加対照群と同等であった (データ未載)。また、前年度、擬陽性の原因菌として報告した *Aeromonas* 属菌 (62-11291 株) を添加し、同様の試験を試みたが、擬陽性反応は認められなかった。以上の結果より、本内部標準の優位性が確認され、これを PCR 反応系へ取り入れることで、より精度の高いスクリーニング検査を担保できることが実証された。

(2) アルカリペプトン水における至適 pH の設定

先述の通り、コレラ菌の検出頻度は極めて低いと想定されたため、増菌培養において、より高い増殖効率を示しうる至適 pH の設定を試みた。まず、*Vibrio cholerae* 01 および 0139 各 3 株を用いて、pH8.6 および pH9.2 のアルカリペプトン水中での増殖性を比較した。血清型 01 の 3 菌株は、何れも両 pH で同等の増殖性を示したが、pH9.2 における 0139 菌株の増殖は、pH8.6 のそれに比べ明らかに低下していた。

更に、市販冷凍エビを用いて、当該菌の添加回収試験を行ったところ、血清型 01 および血清型 0139 は上述の結果と同様に、pH8.6 の APW でより高い増殖性を示した。

(3) 市販冷凍エビからの TCBS 発育菌の分

離と、夾雑菌によるコレラ菌増殖への影響

市販冷凍エビについて通知法に従って、懸濁溶液を調整し、APW で 20 時間培養後、TCBS 寒天培地に接種し、発育したコロニーのうち、優勢な代表 10 コロニーを釣菌し、生化学性状に基づいて、同定した。

病原性を示す *Vibrio* 属である *V. parahaemolyticus*、*V. vulnificus* については、コレラ菌の増殖に大きな影響を及ぼさなかったが、エビより分離された *V. fluvialis* は P6973 株の APW 中での増殖を顕著に抑制した。本菌は pH9.2 の APW でも同様に干渉作用を示した (データ未載) ことから、pH 調整のみによる夾雑菌の増殖抑制は困難と考えられた。

(4) 食品からのコレラ菌検出に伴う PCR 検出限界

上述のように、食品からのコレラ菌検出に際して、本菌の増殖を左右する複数の因子が想定された。実際に食品への接種試験によりコレラ菌の検出限界を検討したところ、 10^1 CFU 以上の接種菌数では血清型に関わらず、PCR スクリーニングは陽性となったものの、1-10CFU 接種食品については非常に弱い PCR 反応を示すに留まった。このことは、本培養法を用いてコレラ菌を検出するためには、少なくとも 10^1 個以上の汚染菌数が必要であることを示している。

(5) リアルタイム PCR 検出系

コレラ菌は、しばしば生きていますが培養できない、いわゆる VNC 状態に陥ることが知られており、その定量的検出は食品におけるコレラ汚染の危険性を図る上では、重要な課題といえる。加えて、先述のとおり、培養によってコレラ菌はしばしば競合的増殖抑制を受けること、そして通知法におけ

る培養では少なくとも 10^1 個以上の汚染菌数が必要であるという結果を受けて、食品汚染の定量化には直接的検出が必要となると考えられた。そこで、我々はより感度の高いリアルタイム PCR 法を用いて、その定量化への道を探った。

1) 対象遺伝子の設定

血清型 O1 および O139 以外の血清型の *V. cholerae* 計 9 株 (9 血清型) については、*ompW* 遺伝子が陽性となったが、*ret* 遺伝子については全て陰性を示した。また、*ret* 遺伝子の多様性についても懸念されたため、代表株について当該遺伝子の塩基配列も決定したが、O1 および O139 菌株間の相同性は 99.9% 以上であり (データ未載)、血清型 O1 および O139 の特異的検出に適した遺伝子候補と考えられた。

2) 各遺伝子のコレラ菌検出感度

各ターゲット遺伝子における定量性を確認するため、 10^0 - 10^5 CFU のコレラ菌懸濁溶液 1ml より全 DNA を抽出し、リアルタイム PCR 反応に供した。各遺伝子は血清型 O1 および O139 に対して、ほぼ同等に定量的な検出結果を示した (データ未載)。

3) Multiplex real time PCR による検出感度および定量性

検出に際する感度・精度の両面から、Multiplex での評価を行った。最終的に何れのターゲット遺伝子もプライマー $250\mu\text{M}$ 、プローブ $175\mu\text{M}$ で特異的な増幅が認められ、それぞれの検出感度にも定量性が認められた。

4) 冷凍エビへの添加回収試験における DNA 抽出法の比較

冷凍エビ 25g に 10^0 , 10^1 , 10^2 CFU/g の *V. cholerae* O1 株を接種後、APW (pH 8.6, 1 %

NaCl) 225ml を添加し、十分にストマッカーにより混合させた後、2.0ml を DNA 抽出に供した。同時に、2.0ml を加熱変性させた。これらを鋳型としてリアルタイム PCR を行ったところ、 10^0 接種群においても、濃縮 DNA 抽出法により、各遺伝子は検出された。

6. 海外渡航者からのコレラ菌分離株

感染研細菌第一部保存株 (1992 年-1997 年) 30 株、および成田空港検疫所保存株 (1999 年-2006 年) 18 株について、パルスネット プロトコールによる PFGE を行った。DNA 消化に使用した制限酵素は NotI であった。サイズマーカーとして *Salmonella* Braenderup H9812 株の DNA を XbaI 消化したものを使用した。泳動像の代表例を図 1 に示す。泳動像はスキャナーを用いてコンピューターに取り込み、Bionumerics ソフトウェアによるクラスター解析を行った。比較のため、異なる 5 種類の血清型からなる NAG ビブリオ (non-O1, non-O139 *V. cholerae*) 分離株 15 株についても同様に処理を行い、クラスター解析に供した。その結果を図 2 に示す。*V. cholerae* O1 株は 1 株を除き、NAG ビブリオ株とは異なるクラスターを形成し、また、NAG ビブリオはそれぞれの血清型でクラスターを形成した。各クラスター間を分ける類似度の閾値は約 75% であった。

V. cholerae O1 株に関しては、ほとんど全てが 80% 以上の類似度を示した一方で、類似度 100% を示したのは 4 組 (8 株) のみであった。このうち 3 組はそれぞれ 1992 年南米、1997 年フィリピン、2005-6 年フィリピンで分離されたもので、年代および

／もしくは地域によって異なるクラスターに分類された。

2005年5月にはインドネシア バリ島への旅行者においてコレラの集団事例が発生した。感染者のほとんどがバリ島の同一ホテルに宿泊し、またコレラ感染のリスク行動でもある生野菜の喫食やプールでの水泳をしていた。病原微生物情報(第27巻、8-9頁、2006年1月号)に掲載された本集団事例関連株のPFGE泳動像を本研究のクラスター解析にあてはめると1997年のシンガポールおよびインドネシア分離株と近縁であることが示唆された。

しかしながら、同じインドネシア分離株でも上記のように同じ小クラスターに入らないものもあり、こうした結果から、PFGEによる解析が今後のコレラ患者の疫学解析において有用であることが示唆された。

今回供した菌株の海外渡航者の疫学情報(n=33)としては、年齢では20代が多く、6割を占めた。性別では男性が7割を占めた。また、リスク要因となりうる食品等の喫食情報は果物、乳製品、ジュースが多く、生野菜、氷などがそれに次いでいた。

D. 考 察

1. 赤痢菌

今回、われわれはカキを試験品とし、厚生労働省から示された参考試験法を改良した試験法により、実際に汚染の可能性のある水産物を検査対象として実用試験を行った。本年度においては、タイ国産のカキとエビについて現地で検査を行い、その結果、カキからは腸炎ビブリオが、また、エビからはサルモネラ菌属の汚染が検出されたが、赤痢菌については従来からの検査法および

今回考案された改良法のいずれの試験法においても検出されなかった。このことから、タイ国産のこれら水産物には赤痢菌による汚染はなかったものと推察された。日本国内で流通する食品から赤痢菌が分離される可能性は極めて低いので、今後は輸入冷凍食品について検証することが必要であると考えられ、また、さらに細菌性赤痢の発生が多い国において、本試験法を現地で検証する必要があると考えられた。

サルモネラ属菌やEHEC 0157は、食品中で容易にVBNCに移行することが報告されており、今回、赤痢菌においても同様な現象が起きることが確認された。発症菌量が著しく低い赤痢菌の場合、VBNC状態で食品を汚染すると、原因食材の特定は著しく困難となる。本研究によりVBNCに赤痢菌が移行することが確認されたので、このVBNCの効率的かつ迅速な蘇生法の確立が今後の検討課題となる。サルモネラの蘇生因子としてRpf蛋白が同定されており、その蘇生法が確立されているので、サルモネラについては、Rpf蛋白による蘇生効果についてさらに検証を行い、検出感度を上げる必要があると考える。また、他の病原菌においても同様な現象が確認されているので、赤痢菌のVBNCについても同様な対応が必要であると考えられる。

2. コレラ菌

コレラを含む2類感染症病原体は、昨秋の法改正により、3類感染症へと移管された。これに伴い、検疫所等での監視対象からも外れることとなったが、本感染症の発生はわが国でも少数ながら毎年発生しており、ルーチン検査として行なわれない体制

への移行期にあたる今こそ、同検査法の精度を更に充実させ、不測の事態に備えておく必要がある。

検疫所での輸入冷凍食品のコレラ菌検査において、PCR 反応系で擬陽性が出たことを受け、前年度は内部標準にその原因があることを明らかにした。本年度は、これを是正するため、新たな内部標準の設定を行い、改善を確認した。

また、冷凍エビへのコレラ菌接種試験の結果から、極めて少数の菌数 (1-10 CFU) を接種した際には検出されない場合も認められた。さらに、食品からのコレラ菌検出に際して、腸炎ビブリオ (*V. parahaemolyticus*) あるいはビブリオバルニフィカス (*V. vulnificus*) はコレラ菌の増殖を干渉しなかったが、エビ検体に多数含まれていた、*V. fluvialis* はコレラ菌の増殖を顕著に抑制していた。これらの結果は、培養法自体の改善を改めて講じる必要性を示唆しているといえよう。

その方法の改善策の一端として、本年度はアルカリペプトン水 (APW) の至適化を行ない、pH8.6 が血清型 01 と 0139 の増殖に有意に高い増殖を示すことを報告した。現行法における APW の規定は、pH8.6 もしくは pH9.2 で 0 もしくは 1%食塩を含むこととされていることから、今回の検討結果を踏まえて、これを修正事項として提案したい。

今から約 10 年前に実施された、輸入魚介類のコレラ菌汚染調査によると、全 7,439 検体中 2,803 検体 (37.4%) が、NAG ビブリオ陽性であった (1) が、それ以降の検疫所での調査では、コレラ菌はほとんど検出されていない。その原因としては、1) 輸出国

における衛生管理の向上により、汚染菌菌が検出されないレベルにまで低下した、2) 通知法の変更 (一例としては、検査対象食品重量が 100g から 25g へ変更) されたために、検出限界が低下した、3) 食品中で、損傷あるいは生きているが培養できない (VNC) 状態 (2) に移行しているために、通常の培養法では検出されないこと、などが想定される。

こうした状況を踏まえ、本年度は極めて低い汚染菌数を検出できるリアルタイム PCR を用いた遺伝学的な定量検出法についての検討を行った。本法では食品 1 グラムあたり 0.1CFU のコレラ菌を検出可能であり、更に対象病原体となる、コレラ毒素 (Ctx) 陽性の血清型 01 及び 0139 を選択的に検出する遺伝子検出系を構築した。本法のフィールド調査への応用は、わが国に流通している、(輸入) 魚介類のコレラ菌汚染実態を正確に把握することが可能となり、ひいてはリスクアセスメントモデルの構築へとつながるものと期待される。

本年度の成果を受けて、来年度は、食品中における汚染実態の把握を行なうとともに、VNC 状態にあるコレラ菌の検出に APW を主体とした培養法がどの程度有効であるのかを明らかにすることで、食品に起因するコレラ症の実態を明らかにしていきたい。

E. 結 論

1. 2 類感染症発生状況を 2006 年 1 月から 2007 年 3 月 15 日までの報告分について感染症サーベイランスシステムをもとに解析した。昨年度の報告書にも記述したが、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。本年度も、赤痢に関しては21%、103例が報告されている。

2. 原因食品情報を、病原微生物検出情報月報と厚生労働省医薬食品局食品安全部監視安全課の食中毒発生状況、医学中央雑誌から検索した。

3. 「自治体が行った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。」という昨年度の結論をふまえ、標準調査票を作成し九州・山口地区において調査を開始した。参考資料として(2)で検索した原因食品情報を添付し、標準調査票の項目を決める際にも使用した。

事例数は少ないが、将来、我が国における疫学調査の標準調査票を作成するための検討を行っている。実際に調査を行う方への疫学調査の重要性を訴える必要がうかがえた。

4. 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しての監視体制を構築する必要があると思われる。

5. 赤痢菌は発症菌数が著しく低いので、食品からの迅速かつ正確な赤痢菌検出法の確立は、食品の安全確保の上で非常に重要である。本年度においては新規に考案された検査法により、タイ国産の水産物を検査

対象として実用試験を試みた。考案された試験法の実用性を検討するためには、今後、汚染率の高い地域における現地での検査およびわが国へ輸入される冷凍食品を検査対象として幅広く検査を実施する必要がある。また、赤痢菌は容易にVBNCに移行することが確認されたので、その蘇生法を早期に確立して検査法に応用する必要がある。

6. 前年度、PCR スクリーニング検査で *ctxA* 擬陽性反応が認められたことから、内部標準の変更を行い、擬陽性反応が生じない系を確立した。

7. 一次増菌に用いるアルカリペプトン水(APW)の至適条件を、コレラ菌の増殖性および他菌による増殖抑制の点から検討し、1%食塩を含むpH8.6が選択的かつ高い増殖効率を示す条件であることを確認した。

8. 食品中から病原性の高い、すなわち制御すべき対象となるコレラ菌を低い菌数でも定量的に検出できる遺伝学的手法を構築した。

9. 最近発生する海外渡航歴のないコレラの感染源はほとんど不明のままである。しかしながら、コレラのそもそもの発生地はアジアにあり、渡航歴のあるコレラ患者の原因菌を解析することでコレラ菌の現状を把握することは、国内例の感染源の解明にも役立つことと考えられる。患者の喫食調査、行動調査とともに、こうした菌株の疫学解析も重要と考えられる。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Morita M, K. Ito, K. Hirose, H. Takahashi, K. Shimuta, J. Terajima, M. Ohnishi, M. Harada, M. Matsuzaki, H. Watanabe and H. Izumiya. Development of a Real-Time PCR Assay for Detection of *gyrA* Mutations Associated with Reduced Susceptibility to Ciprofloxacin in *Salmonella enterica* Serovar Typhi and Paratyphi A. Microbiol. Immunol. 50 (9): 707-711, 2006.
- 2) Morita M, K. Ito, K. Hirose, H. Takahashi, K. Shimuta, J. Terajima, M. Ohnishi, M. Harada, M. Matsuzaki, H. Watanabe and H. Izumiya. Development of a Real-Time PCR Assay for Detection of *gyrA* Mutations Associated with Reduced Susceptibility to Ciprofloxacin in *Salmonella enterica* Serovar Typhi and Paratyphi A. Microbiol. Immunol. 50 (9): 707-711, 2006.

2. 学会発表

- 1) Sou-ichi Makino. Resuscitation of the viable but non-culturable (VBNC) state of *Salmonella enterica* serovar Oranienburg by recombinant resuscitation-promoting factor derived from *Salmonella* Typhimurium strain LT2. In 10th International Symposium on Toxic Microorganisms- Meeting the Challenges of Toxic Microorganisms and Pathogens: Implications for Food Safety and Public Health-. Washington, DC (2006年11月7-9日)
- 2) 朝倉宏、石和玲子、山本茂貴、五十君静信. Multiplex real time PCR を用いた魚介類からの *Vibrio cholerae* 検出に関する研究. 第 27 回日本食品微生物学会学術

総会. 2006年9月. 大阪.

H. 特許出願状況
特になし

平成18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・飯田真里子(感染症情報センター)、森屋一雄(佐賀県健康福祉部)、中山宏(福岡県健康福祉部)、長山澄彦(長崎県福祉保健部)、九州・山口地区19自治体感染症担当者、松崎充宏(海事検定協会)

研究要旨

2類感染症の国内感染事例における原因食品を推定するため、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感染症サーベイランスシステムにより解析した。また、原因食品情報を医学中央雑誌、病原微生物検出情報月報及び厚生労働省医薬食品局食品安全部監視安全課の食中毒発生状況から収集した。(2)九州・山口地区での国内発生事例の積極調査、さらに(3)パイロット試験として食材の検査を継続した。

A. 研究目的

我が国では、細菌性2類感染症のうち、赤痢及びコレラは常在していないと考えられる。また、腸チフス・パラチフスにおいても長期保菌者は少なくなり、感染地はほとんどが海外となってきている。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。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である。さらに、事例数が少ないため各自治体の行っている喫食調査では疫学的に推計が困難であることなどからくる。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を検討する。

B. 研究方法

(1)2類感染症発生状況を感染症サーベイランスシステムに2006年1月から2007年3月15日までの報告についてまとめた。また、

病原微生物検出情報月報と厚生労働省医薬食品局食品安全部監視安全課の食中毒発生状況を検索し、さらに、医学中央雑誌から、細菌性赤痢、コレラ、腸チフス、パラチフスをキーワードに最近5年間(2001年から2006年)に邦文雑誌に掲載された論文を検索した。

(2)赤痢を中心にコレラ、腸チフス・パラチフスの国内事例について九州・山口県の19自治体で積極的疫学調査を行った。標準喫食調査票と疑い食品一覧表の作成及び調査協力依頼用のパンフレットを作成した。埼玉県で行った「O157等感染症発生原因調査事業」で使用した喫食・行動調査票を参考にして作成した。感染研と九州・山口感染症対策プロジェクト事務局で1回の打合せをおこない、それを受けて九州・山口県内の全19自治体の感染症担当者と2回の会議を開き標準調査票の作成と調査の方法を練り、7月25日から調査を開始した。

(3) 昨年に続き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。

C 結果と考察

1. 2 類感染症の発生状況

(1) 感染症サーベイランスシステムからの情報

わが国で2006年に報告された腸チフス患者は62名(推定国内感染10名)、パラチフス患者25名(同1名)、コレラ患者39名(同8名)で、赤痢患者は1桁多く488名(同105名)であった(表1-表3)。若干の増減はあるが、海外及び国内事例とも昨年までとほぼ同様な傾向であった。原因食品はほとんどが不明である。また、2007年1月から3月15日までの報告数は、腸チフス6名(推定国内感染2名)、パラチフス5名(同1名)、コレラ3名(同1名)及び赤痢102名(同13名)であった。

感染症サーベイランスシステムは2006年4月から新システムに移行したため、それぞれの感染症についての解析は、2006年4月から2007年3月までについて行った。旧システムについては2006年1月～3月についてまとめたものを別欄に載せた。

1) 腸チフス・パラチフス

表1に示すように、2006年4月から2007年3月の間に報告された腸チフス国内発生例は、10例で、男性7例と女性3例であった。年齢は17歳から78歳以上に分布した。78歳と61歳の女性及び30歳の男性の計3名が無症状病原体保持者であった。発症月に偏りはみられなかった。78歳の女性は27歳男性患者の祖母で、この1事例のみが家族例であった。感染源は特定できなかった。

パラチフスは2例のみで、22歳の男性と84歳の女性であった。いずれも、散发例で感染源は特定されなかった。

2) 赤痢

表2に示すように、2006年4月から2007年3月の間に報告された赤痢国内発生例は、103例(発生数の21%)で、男性52例と女性51例とほぼ同数であった。表7に赤痢国内発生例一覧を示した。年齢は1歳から98歳まで分布した。9例が無症状病原体保有者で、5歳以下2名、20代4名、40代1名、50代2名に分布し、男性6名と女性3名であった。集団発生や患者家族の検査によって見つけられるケースがほとんどである。発症月では、9月と10月がそれぞれ25名と24名で、他の月の2名～8名と比べ目立って多かった。9月は家族内事例が3件と多く、さらに石川県におけるすし屋関連の集団事例によるもので、10月は大阪府の保育園の集団事例と鈴鹿サーキットに関連する集団によるものであった。また、10月には宮城と大阪と離れているが、2事例で推定原因食にイカの塩辛や生食を挙げていたのが目を引いた。感染源特定はなかったが、備考欄には、前述したイカ以外に、白子、鶏ささみ、豚肉すき焼き、焼き肉、幕の内弁当などが記載されている。

菌種別ではソネ菌が7割～8割を、フレキシネル菌が2割強を占めていて、例年と同様であった(表5)。国内事例はソネ菌の割合が7割と海外例の8割に比べ若干低かった。大きな集団事例は石川県の寿司屋と大阪府の保育園の2件あり、さらに、鈴鹿サーキットで飲食し4名が発病している(表7)。表4は食中毒事例状況をまとめたものだが、赤痢は毎年1から3件が食中毒事件として届けられていたが、最新の2005年では0件となっている。この年は施設で集団事例が起こっているが食中毒としては報告されていない。

い。食品衛生法施行規則が改正され、病因物質に赤痢菌が追加されてから、届け出がないのは初めてである。

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8件あった。2001年18件、2002年31件、2003年12件、2004年14件、2005年10件と推移しているが、本年度も相変わらず多く注意が必要である。年齢分布は、海外例では20代に明らかなピークがあり、一方国内例では61歳以上が若干多くなっているが、全年齢層になだらかに分布(表6)していた。これも例年と同じ傾向である。

3) コレラ

表3に示すように、2006年4月から2007年3月の間に報告されたコレラ国内事例は7例で、男性8例(2例は疑似症患者)と女性1例であった。年齢は31歳の疑似症患者の他は68歳以上で国内コレラ患者が高年齢者に多い傾向は変わらなかった。発症月は夏場をはさみ6月から11月の間に7件、1月に1件であった。2次感染を疑わせる事例はなかった。いずれも感染源は特定できなかった。

(2) 原因食品情報

医学中央雑誌でコレラ、腸チフス、パラチフスをキーワードに最近5年間(2001年から2006年)に邦文雑誌に掲載された報告を検索した。約450件がヒットした。そのうち、概要から原因食品について記述がありそうな論文を63篇選び出した。また、病原微生物検出情報についても最近5年間(2001年から2006年)の特集および特集関連記事や国内速報記事について検索した。病原微生物検出情報月報と厚生労働省医薬食品局食品安全部監視安全課の食中毒発生状況を検索した。これらをまとめて推定を含む原因食品について表を作成した(表8)。

食品から原因菌として赤痢菌が検出されたのは、2000年から2001年にかけて、全国で150名以上の感染者を出した韓国産牡蠣による1例だけであった。推定原因食品ではやはり魚介類が多く、マグロ・イカ、刺身、赤貝、輸入冷凍魚介類などがあげられている。サラダや漬物も多く、人参サラダ、韓国産キムチ、小カブの浅漬けなどがあげられている。また、従業者からの2次的な感染や手洗い水による感染、消毒不良による水道水の感染も報告されている。

2. 九州・山口地区における積極的疫学調査

赤痢を中心にコレラ、腸チフス・パラチフスの国内事例について九州・山口県の19自治体で積極的疫学調査を行った。標準喫食調査票と疑い食品一覧表の作成及び調査協力依頼用のパンフレットを作成した。埼玉県で行った「O157等感染症発生原因調査事業」で使用した喫食・行動調査票を参考にして作成した。感染研と九州・山口感染症対策プロジェクト事務局で1回の打合せをおこない、それを受けて九州・山口県内の全19自治体の感染症担当者と2回の会議を開き標準調査票の作成と調査の方法を練り、7月25日から調査を開始した。

九州・山口地区の赤痢国内事例は調査開始から5件(2006年で6件)あり、そのうち3件で標準調査票による調査が行われた(表7b)。腸チフスは1件あったが、無症状病原体保有者で標準調査票による調査は行わなかった。同地区でのパラチフスとコレラの国内事例はなかった。標準調査票を使用できなかった2事例では時間不足により態勢準備ができなかったことが影響している。調査を通じて、(1)患者の居住地と医療機関の住所が異なっていた場合にどちらの自治体がイニシアチブをとるかあいまいである、(2)

症状が軽い場合は医療機関でも見逃してしまう可能性があることが問題点として挙げられた。(1)については、厚生労働省担当部局に問い合わせ、「医療機関の所在地の自治体が行う」ということが確認できた。(2)については、平成13年度厚生科学研究「生活安全総合研究事業」諸外国における食品媒介感染症に対する調査の研究の中で岩崎恵美子博士が指摘しているように「下痢症患者の治療を始める前に必ず下痢便調査を実施するという医師の割合は7%と少ない」こともあり、患者発生の全国または地域の情報を流すなどなんらかの啓発策が必要と思われる。

資料として、(1)赤痢・コレラ感染症発生原因調査票、(2)腸チフス・パラチフス感染症発生原因調査票、(3)細菌性赤痢・コレラ・腸チフス・パラチフス国内発生事における原因調査実施要領、(4)パンフレット、(5)細菌性赤痢・コレラ・腸チフス・パラチフス国内発生事における原因調査についての依頼文を載せた。

(3)食品の検査

平成18年度は18種類の市販生鮮野菜について合計103検体について行った。内訳は、なす(検体数4、以下同様)、白菜(2)、ねぎ(1)、キャベツ(22)、もやし(18)、小松菜(13)、きゅうり(12)、ピーマン(1)、玉ねぎ(2)、ほうれん草(3)、かぶ(4)、しめじ(3)、えのき(2)、大根(1)、人参(1)、さやいんげん(4)、にら(4)、アスパラガス(2)の計103検体である。

Klebsiella-Enterobacter 群が、ピーマン、玉ねぎ、えのきを除く他の15種類から検出された。きゅうり、小松菜、えのき、白菜、ほうれん草から *Citrobacter freundii* が、にら、キャベツ、小松菜、さやいんげんから *Escherichia coli* が検出された。腸管出血性

大腸菌 O157 については、103 検体すべて陰性であった。

D 結論

(1)2類感染症発生状況を2006年1月から2007年3月15日までの報告分について感染症サーベイランスシステムをもとに解析した。昨年度の報告書にも記述したが、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。本年度も、赤痢に関しては21%、103例が報告されている。

(2)原因食品情報を、病原微生物検出情報月報と厚生労働省医薬食品局食品安全部監視安全課の食中毒発生状況、医学中央雑誌から検索した。

(3)「自治体が行った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ことができない。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。」という昨年度の結論をふまえ、標準調査票を作成し九州・山口地区において調査を開始した。参考資料として(2)で検索した原因食品情報を添付し、標準調査票の項目を決める際にも使用した。

事例数は少ないが、将来、我が国における疫学調査の標準調査票を作成するための検討を行っている。実際に調査を行う方への疫学調査の重要性を訴える必要がうかがえた。

(4)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しての監視体制を構築する必要があると思

われる。

E. 発表業績

1. 発表論文

Morita M, K. Ito, K. Hirose, H. Takahashi, K. Shimuta, J. Terajima, M. Ohnishi, M. Harada, M. Matsuzaki, H. Watanabe and H. Izumiya. Development of a Real-Time PCR Assay for Detection of *gyrA* Mutations Associated with Reduced Susceptibility to Ciprofloxacin in *Salmonella enterica* Serovar Typhi and Paratyphi A. Microbiol. Immunol. 50 (9): 707-711, 2006.

2. 学会発表 なし

F. 知的所有権取得状況 なし

表1a. 腸チフスの年次別・推定感染地域別報告数(疑似症を含む)

報告年	月	海外			国内			不明	合計
		男性	女性	合計	男性	女性	合計		
2006	1-3	7	4	11	2	0	2	1	14
2006	4-12	39	11	50	6	2	8	0	58
2007	1-3	2	2	4	1	1	2	0	6

感染症発生動向調査 2007. 3. 15 現在

表1b. 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)

報告年	月	海外			国内			不明	合計
		男性	女性	合計	男性	女性	合計		
2006	1-3	4	0	4	0	0	0	0	4
2006	4-12	11	9	20	1	0	1	0	21
2007	1-3	4	0	4	0	1	1	0	5

感染症発生動向調査 2007. 3. 15 現在

表 2. 赤痢の年次別・推定感染地域別報告数(疑似症を含む)

報告年	月	海外			国内			不明	合計
		男性	女性	合計	男性	女性	合計		
2006	1-3	56	43	99	7	8	15	4	118
2006	4-12	137	143	280	45	45	90	0	370
2007	1-3	38	51	89	7	6	13	0	102

感染症発生動向調査 2007. 3. 15 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)

報告年	月	海外			国内			不明	合計
		男性	女性	合計	男性	女性	合計		
2006	1-3	5	1	6	0	2	2	0	8
2006	4-12	18	7	25	5	1	6	0	31
2007	1-3	2	0	2	1	0	1	0	3

感染症発生動向調査 2007. 3. 15 現在

表 4. 食中毒事件

年	コレラ	赤痢	腸チフス	パラチフス
2003	0	1(10)	0	0
2004	0	1(14)	0	0
2005	0	0	0	0

厚生労働省医薬食品局食品安全部監視安全課、食中毒発生状況

表 5. 赤痢の型別(疑似症を除く)

年	月	ボイド	志賀	フレキシネル	ソンネ	型別不能	合計
2006	1-3	1(0)	0(0)	16(2)	36(6)	0(0)	53(8)
2006	4-12	4(1)	2(0)	72(21)	281(64)	0(0)	359(86)
2007	1-3	1(0)	3(0)	12(5)	82(6)	2(1)	100(12)

感染症発生動向調査 2007. 3. 15 現在

() 内は国内発生例

表 6. 2006 年 4 月から 2007 年 3 月に報告された赤痢患者
の推定感染地別年齢分布

年齢	海外		国内		合計	
	男性	女性	男性	女性	男性	女性
20 歳以下	9	10	17	14	26	24
21-30 歳	63	89	10	8	73	97
31-40 歳	42	38	7	4	49	42
41-50 歳	23	15	4	5	27	20
51-60 歳	13	19	6	6	19	25
61 歳以上	20	19	7	12	27	31
合計	175	194	52	51	227	245

感染症発生動向調査 2007. 3. 15 現在