

平成20年1月 日

各自治体感染症対策担当課長 様

国立感染症研究所 感染症情報センター長

平成19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  
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」に係る調査方法アンケートについて（依頼）

当所の感染症行政につきましては、日ごろから御協力をいただき厚くお礼申し上げます。

さて、標記研究事業について下記のとおりアンケートを行いますのでご協力をお願いいたします。本研究事業も3年目で全体のまとめとなります。3年間で行った報告書・文献等に掲載された原因物質、九州・山口地区における調査、食品の検査結果をまとめ、旧2類感染症の原因食品の調査方法についての提言を掲載するように準備しております。最近の傾向では九州・山口地区の国内発生例は年間10例程度でしたが、幸いなことに本年度の調査期間中には0件という状況です。用意した標準調査票等を使用した調査がまだ行われていないので、発生した場合にどのように対処しているか及び標準調査票についてのご意見についてアンケートをお願いする次第です。業務多忙のところ誠に恐縮ですが、御配慮をよろしく申し上げます。

#### 記

1 アンケート：別紙

2 調査対象：保健所調査担当者にアンケート用紙を配布し各自治体で回収し、九州・山口地区事務局で一括し、感染症研究所感染症情報センター（担当 5室室長 伊藤）に送付。

3 回収締め切り：平成20年2月15日

今後の参考にさせていただくため以下のアンケートをお願いいたします。

I \_\_\_\_\_ 県 \_\_\_\_\_ 保健所

II 調査について

1) 赤痢・コレラ・腸チフス・パラチフスの患者調査の場合

調査担当者のご所属： 感染症担当 食品担当 その他(\_\_\_\_\_)

調査の方法： 1) 対面 2) 留め置きのち回収 その他(\_\_\_\_\_)

調査の時間： 時間 分 ( 2) の場合は説明時間を記入してください)

2) 腸管出血性大腸菌の患者調査の場合

調査担当者のご所属： 感染症担当 食品担当 その他(\_\_\_\_\_)

調査の方法： 1) 対面 2) 留め置きのち回収 その他(\_\_\_\_\_)

調査の時間： 時間 分 ( 2) の場合は説明時間を記入してください)

散発と集発で調査の上記の項目は異なりますか？

(\_\_\_\_\_)

(\_\_\_\_\_)

(\_\_\_\_\_)

III 調査の趣旨を理解していただくため改善した方が良いと思われる点

1) 調査票

2) パンフレット

3) その他

ご協力ありがとうございました。

資料7 簡易赤痢国内発生原因調査票

患者ID \_\_\_\_\_ ( 県 ) 菌種:SONNEI

発症前の1週間に、以下の1～5の行動について、ご回答ください。

1. 行事参加

無・有: 行事名、開催地、月日(期間)

2. 旅行・行楽

無・有: 旅行地/行楽地/宿泊先・名称(可能な限り詳細な情報)・月日(期間)

3. 外食

無・有: 店名[不可能なら、種類(寿司屋、中華料理店、焼肉店など)]・食べたもの・月日

4. 以下の(1)～(3)に該当するものの喫食

(1) 輸入食品・食材(輸入キムチ、輸入エビなど)

無・有: 食品・食材名、購入店、購入した月日と食べた月日

(2) 冷凍食品・食材(冷凍むきエビ、シーフードミックスなど)

無・有: 食品・食材名、購入店、購入した月日と食べた月日

(3) 参考資料に掲載されたもので該当するもの

無・有: 食品・食材名、購入店、購入した月日と食べた月日

5. 本人及び家族の渡航歴

本人 無・有: 感染地域を国内とした理由

家族 無・有: 渡航先: 月日(期間)

6. 保健所の感染源調査の結果、推定または特定された感染源(感染原因)

※ 感染原因がヒトと判断される場合(=二次感染、接触感染)は、その人

無・有: その感染源(感染原因)、判断された理由

## H17-新興-13

「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」  
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  
分担研究者 相楽裕子 横浜市立市民病院（感染性腸炎研究会）

### 1 目的

2類感染症（2007年4月以降3類感染症）として類型化されている疾患のうち，食品媒介性に発生するものとして，細菌性赤痢，コレラ，腸チフス，パラチフスが挙げられる。いずれも国外由来事例が多いが，食品由来と推定される国内事例も発生している。細菌性赤痢に関しては，生カキの摂食による国内事例。機内食が原因となった食中毒事例等が発生している。コレラに関しては毎年のように国内事例が報告されている。腸チフス，パラチフスについては潜伏期間が2週間前後と長いため，散發事例での原因検索は不可能に近い。

細菌性赤痢やコレラが国内で発生する要因の一つに食品や水が原因として挙げられる。それらの食品の汚染が海外由来なのか国内由来なのか実態は不明である。本研究では，感染性腸炎研究会において取り扱った細菌性赤痢とコレラの国内事例を対象に行った調査を通して食品由来2類感染症のリスクアセスメントを行い防御対策への貢献を試みた。

### 2 対象と方法

2000年1月から2006年12月までの7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または通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た。

### 3 結果

#### 1) 患者背景

細菌性赤痢の患者数は358，うち国内例は44（12.3%），国内例の判明した血清型は*S.flexneri* 10，*S.sonnei* 29であった。コレラの患者数は35，うち国内例は6（17.1%），すべて血清型O1でコレラ毒素産生性であり，生物型Eltor Ogawa, Eltor Inaba 各3であった。

#### 2) 年齢・性別（表1）

細菌性赤痢患者358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44（12.3%）は全年齢層に分布し，20歳未満の41.9%，60歳以上の34.6%が国内例であった。コレラ患者は35例で，20代と50代以降（8，17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。患者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，国内例でも同様の傾向であった。

#### 3) 原因が推定された国内事例（表2）

国内例のうち，原因が推定された細菌性赤痢39例，コレラ6例についてまとめた。食品媒介性と推定された事例は細菌性赤痢12例，コレラ4例であった。赤痢菌の血清型は*S.sonnei*が圧倒的に多かった。コレラ菌はEltor Ogawa, Eltor Inabaが各2であった。推定原因とされた飲食物は細菌性赤痢では海鮮丼，すし，刺し身，イクラ醤油漬等，コレラでは3例が路上生活者で食品・水媒介性と推定された。いずれも保健所の調査では原因は特定されなかった。その他，細菌性赤痢では学生寮やキャンプでの集団発生5例と家族内発生4例がみられた。集団事例は食品媒介性と推定された。

### 4 考察

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15%前後であった。細菌性赤痢の場合には家庭内の二次感染があるため，国内例のどこまでが食品・水媒介性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。今回原因が推測された事例では細菌性赤痢もコレラも生鮮魚介類の関与が疑われた。

両疾患とも2007年4月から3類感染症に移行したため，今後は食中毒としての届け出がなければ原因調査はさらに困難になるであろう。発生数が減少し

たとはいえ、食料自給率の低い我が国では輸入食品を通して国内に持ち込まれる可能性は高い。日常のサーベイランスとともに侵入した場合の早期発見システムを確立しておく必要があると思われる。

**研究協力者：**山下和予（国立感染症研究所感染症情報センター）、大西健児（東京都立墨東病院）、角田隆文（東京都保健医療公社荏原病院）、今村顕史（東京都立駒込病院）、滝沢慶彦（札幌市立札幌病院）、山陰敬（仙台市立病院）、深山牧子・濁川博子（東京

都立豊島病院）、寺野隆（千葉市立青葉病院）、小花光夫・小井戸則彦（川崎市立川崎病院）、水野芳樹（名古屋市立東市民病院）、清水恒広（京都市立病院）、阪上賀洋（大阪市立総合医療センター・感染症センター）、春田恒和（神戸市立中央市民病院）、藤井肇（広島市立舟入病院）、青木知信（福岡市立こども病院・感染症センター）、岡田薫（北九州市立医療センター）

表1 細菌性赤痢とコレラの患者背景

年齢層	0～	10～	20～	30～	40～	50～	60～	70～	計	男	女
細菌性赤痢 総数	11	20	188	82	18	13	17	9	358	170	187
国内例	5	8	10	7	2	3	6	3	44	21	23
コレラ 総数	1	0	8	5	4	10	1	6	35	23	12
国内例	0	0	0	0	1	2	1	2	6	4	2

表2 原因が推測された国内事例（細菌性赤痢とコレラ）

	年齢	性	発病年月日	分離菌	情報
食品媒介疑い	37	女	2000/8/26	<i>S.sonnei</i>	8/25 回転すし、夫も発病（菌陰性）
	29	女	2001/11/16	<i>S.sonnei</i>	11/15 ベトナム料理
	28	男	2001/12/11	<i>S.flexneri</i> 2a	12/9 法事で刺し身
	85	男	2001/12/12	不明	発症前に生ガキ
	76	男	2002/9/30	<i>S.flexneri</i> 1b	9/29 スーパー銭湯でみそカツ、おでん、枝豆
	31	女	2002/9/29	<i>S.sonnei</i>	9/27 海鮮丼
	31	男	2003/6/21	<i>S.sonnei</i>	6/15 寿司
	28	女	2004/6/19	<i>S.sonnei</i>	6/17 海鮮丼
	66	男	2004/9/5	<i>S.sonnei</i>	9/4 しめ鯖、イクラ醤油漬
	49	男	2005/1/9	<i>S.sonnei</i>	1/8 しゃぶしゃぶ、キムチ
	34	男	2005/5/15	<i>S.sonnei</i>	5/14 バーベキュー
	38	女	2006/11/10	<i>S.sonnei</i>	11/4 上海ガニ
	45	男	2001/6/29	<i>V.cholerae</i> O1 Eltor Inaba	路上生活者。公園のトイレの水で調理、隅田川で採れたカメを食べた。
	59	男	2001/7/9	<i>V.cholerae</i> O1 Eltor Inaba	上記の同僚。公園のトイレの水で調理、隅田川で採れたカメを食べた。
	54	男	2005/4/30	<i>V.cholerae</i> O1 Eltor Ogawa	4/27 居酒屋で刺し身

	72	男	2006/6/6 (?)	<i>V.cholerae</i> O1 Eltor Ogawa	路上生活者。ショック状態で発見
集団感染	19	女	2001/5/11	<i>S.sonnei</i>	食事付き学生寮集団例
	19	女	2001/5/11	<i>S.sonnei</i>	食事付き学生寮集団例
	18	女	2001/5/11	<i>S.sonnei</i>	食事付き学生寮集団例
	19	女	2001/5/11	<i>S.sonnei</i>	食事付き学生寮集団例
	7	男	2005/8/1	<i>S.sonnei</i>	7月下旬集団キャンプ（他に2名発病）
家族内感染疑い	30	男	2000/4/13	<i>S.sonnei</i>	妻が2月にベトナム旅行
	37	女	2002/2/19	<i>S.sonnei</i>	児（7歳）が2日前に発病（国内感染感染源不明）、家族内感染
	8	男	2004/8/9	<i>S.sonnei</i>	中国から帰国直後の祖母宅に滞在（8/6-8/8）。 8/7、8/8 焼き肉
	54	女	2006/8/27	<i>S.sonnei</i>	8/11-8/17 夫が中国出張、8/18 より下痢（検便2回陰性）、8/26、8/27 刺身

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（H17-新興-13）

食品における赤痢菌検出法の標準化と感度の向上

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・教授

研究協力者；

川本恵子（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・助教授）

門田修子（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・大学院生）

武士甲一（国立大学法人帯広畜産大学・畜産学部・教授）

研究要旨 赤痢菌は、グラム陰性桿菌で細菌性赤痢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であると考えられており、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。これらの結果を受け、本年度は、赤痢菌の検出感度の上昇を図るために、VBNS状態への以降した赤痢菌の蘇生因子について検討した。

A. 研究目的

現在、食中毒発生時において汚染食品が特定された事例は、全体の約3割と非常に低い。それには様々な理由が挙げられるが、疫学調査の困難さに加え、簡便で正確な検出法がないこと及び生きているが培養できない細菌の存在が検出を困難にしている場合も考えられる。このため、従来の微生物学的検出法に加え、より検出感度と簡

易・迅速性に優れた新たな検出法の開発が求められている。

これまで細菌性赤痢感染症は、海外で食品や飲料水を介して感染するいわゆる輸入感染症がほとんどであったが、近年では発展途上国などへの渡航歴のないにもかかわらず、国内での感染例が増加傾向にある。その感染源として汚染食品が考えられており、実際に2001年には西日本で韓国



産輸入カキが原因となって細菌性赤痢が発生した。

本菌は、腸内細菌科に属するグラム陰性桿菌で、細菌性赤痢の原因菌である。「感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律」で二類感染症に指定されている。大腸菌との DNA 間の相同性は 85%以上と非常に高く、同一菌種内に含まれる値であるが、医学細菌上の重要な病原体として位置付けられているため、大腸菌属から独立している。ヒトにおける発症菌数が 10 個以下と少ないため、食品からの迅速かつ正確な赤痢菌の検出法の確立は、食品の安全確保の上で非常に重要である。本研究では、食品から赤痢菌を検出する方法を確立し、その標準化と感度の向上を図ることを目的とした。

初年度においては、輸入カキを原因とする細菌性赤痢が発生した際、2001 年に厚生労働省が各都道府県に配布した参考試験法を基本とし、これに変更を加えた方法を新規検出法として食品からの赤痢菌検出法を考案した。本年度においては、この方法を実際の検体に応用し、その有用性について確認を行った。

また、サルモネラ属菌や EHEC O157 は食品中で容易に“生きているが培養できない状態(VBNC)”に変化することが知られており、このような状態は見かけ上菌数が少なく検出されるが、実際は病気を起こす能力を保持している。VBNC 状態に入った細菌は、現在の検査法では検出が困難であり、食品衛生上大きな問題になると考えられており、特に発症菌数が少ないと考えられている赤痢菌の場合はさらに深刻であると推察される。そこで、本年度は赤痢菌が VBNC 状態に入り込む可能性の有無について検討し、その蘇生法の基礎資料を得ることを目的として実験を行った。

## B. 研究方法

### 1. 使用菌株および培地

当研究室の保管株である *Shigella flexneri* YSH6000 を Trypticase-Soy Broth (TSB、Becton Dickinson)にて一晚培養し、滅菌生

理食塩水で希釈して使用した。分離用の固形培地については Trypticase-Soy Agar (TSA)を使用した。

### 2. VBNC への誘導実験と蘇生因子のクローニング

保存株を TSB にて一晚培養後、遠心し、洗浄して得られたペレットを滅菌済みの 3%、7%、13% NaCl 溶液に各々懸濁し、37°Cにて静置培養した。培養後、各菌液を TSA にプレーティングして培養能を試みる一方、BacLight 染色を行ってその生存率を観察した。また、*Salmonella* の *rpf* 遺伝子の配列を基に赤痢菌のゲノムデータベースを利用して PCR 法により *rpf* 遺伝子をクローニングした。上記でクローニングした配列から組換えタンパクを作成、精製した。さらに、濃度別(0.001~10µg/ml)の rRpf を含んだ培地(5%BHI ブロス)に VBNC 状態の赤痢菌を接種後、7日間培養しコロニー形成の有無を確認する事により赤痢菌由来の組換え Rpf タンパクによる VBNC 状態からの蘇生が成立するか観察した。

### 3. 培養上清の増殖促進能試験

赤痢菌を通常の培養後、滅菌生理食塩水で洗浄後、赤痢菌の培養上清(ろ過滅菌済み)を適当に TSB 培地により希釈し、適当な菌数を接種し、37°Cで24時間まで培養し濁度を測定することにより増殖を調べた。

## C. 研究結果

### 1. 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(図 1)。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。

### 2. 蘇生因子について

*Salmonella* の *rpf* 遺伝子の配列を基に赤痢菌のゲノムデータベースを利用して PCR 法により *rpf* 遺伝子をクローニングし

た。PCRの結果得られたPCR断片のTAクローニングにより塩基配列を決定し(図2)、更にPCR断片をGST融合タンパク発現用ベクターpGEX-6P-1にクローニングし、大腸菌BL21をトランスフォーメーションした。IPTG1 mM添加後8時間で発現誘導し、GSTカラムとタグ切断酵素による精製後、SDS-PAGEを行った結果アミノ酸配列から推定される25KDa付近にバンドが見られた事から、赤痢菌の組換えタンパクの作成と精製に成功したと考えられた。rRpfによるVBNCからの蘇生は、培養期間中のサンプルからコロニー形成が見られず、今回の条件では蘇生を誘導できなかった。

### 3. 増殖因子の存在について

赤痢菌の培養上清を赤痢菌に加え培養すると、12時間後には増殖促進効果のあることが明らかになった(図4)。この効果は培養上清の濃度に依存していた。接種した赤痢菌の菌数は1mlあたり2.6個であり、菌数が高くなるが、その原因は明らかにならなかった(結果示さず)。

### D. 考察

サルモネラ属菌やEHEC O157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。一方、赤痢菌の培養上清中には赤痢菌の増殖に関与する物質の存在が示唆された。このことは、

赤痢菌の検査過程において、わずかの菌数の赤痢菌を検出する系に応用できるのではないかと考えられ、実際の現場での使用に有用になる可能性が示唆された。

### E. 結論

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。

### F. 健康危険情報

特に無い。

### G. 研究発表

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. 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.

### H. 特許出願状況

特にない

図1. VBNC誘導

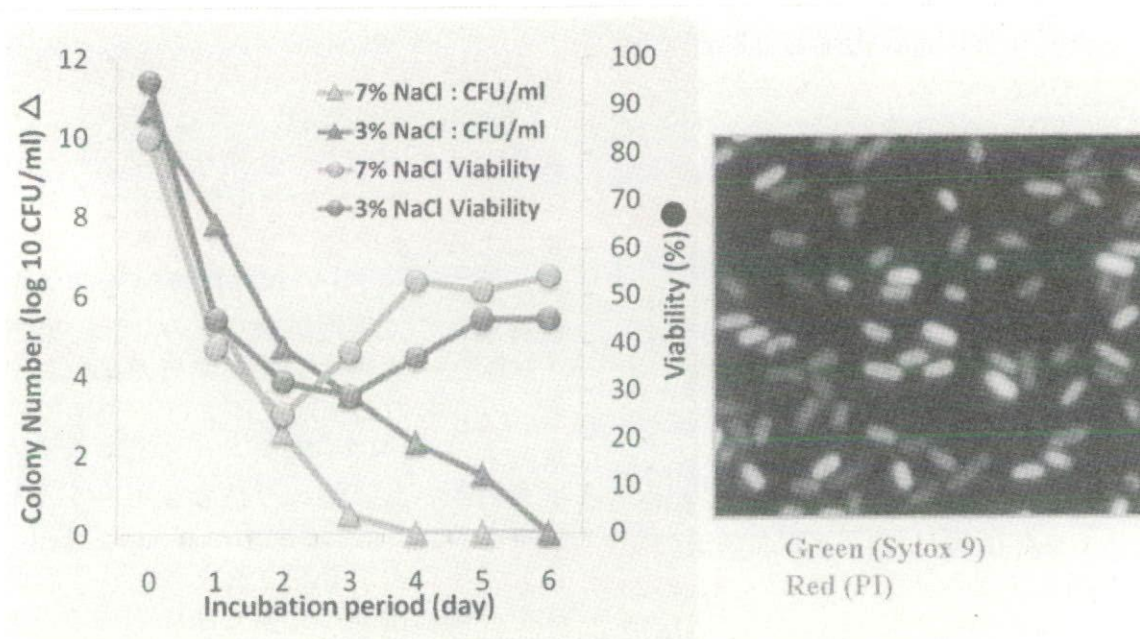


図2. 各種Rpf蛋白のアミノ配列の比較

flexineri AA.seq	1	MRI LAIDTATEACSV ALWNDGTVNAHFELCPREHTQRILPMVQDILTTSGTS L TDINALA	60
sonnei AA.seq	1	MRI LAIDTATEACSV ALWNDGTVNAHFELCPREHTQRILPMVQDILTTSGTS L TDINALA	60
Oranineburg Rpf AA.seq	1	MRI LAIDTATEACSV ALWNDGTVNAHFELCPREHTQRILPMVQDILTTSGTS L TDINALA	60
0157 rpf AA.seq	1	MRI LAIDTATEACSV ALWNDGTVNAHFELCPREHTQRILPMVQDILTTSGTS L TDINALA	60
flexineri AA.seq	61	YGRGPGSFTGVRI GIGIAQGLALGAELPMIGVSTLMTMAQGAWRKN GATRVLSAIDARMG	120
sonnei AA.seq	61	YGRGPGSFTGVRI GIGIAQGLALGAELPMIGVSTLMTMAQGAWRKN GATRVLSAIDARMG	120
Oranineburg Rpf AA.seq	61	YGRGPGSFTGVRI GIGIAQGLALGAELPMIGVSTLMTMAQGAWRKN GATRVLSAIDARMG	120
0157 rpf AA.seq	61	YGRGPGSFTGVRI GIGIAQGLALGAELPMIGVSTLMTMAQGAWRKN GATRVLSAIDARMG	120
flexineri AA.seq	121	EYYWAEYQRDENG IWHGEETEAVLKP ELVHERMQQLSGEWVTVGTGWQAWPDLGKESGLV	180
sonnei AA.seq	121	EYYWAEYQRDENG IWHGEETEAVLKP ELVHERMQQLSGEWVTVGTGWQAWPDLGKESGLV	180
Oranineburg Rpf AA.seq	121	EYYWAEYQRDENG IWHGEETEAVLKP ELVHERMQQLSGEWVTVGTGWQAWPDLGKESGLV	180
0157 rpf AA.seq	121	EYYWAEYQRDENG IWHGEETEAVLKP ELVHERMQQLSGEWVTVGTGWQAWPDLGKESGLV	180
flexineri AA.seq	181	LRDGEVLLPAAEDMLPIACQMF AEGKTVAVEHAKPVYLRNNVAVK KLPGKE	231
sonnei AA.seq	181	LRDGEVLLPAAEDMLPIACQMF AEGKTVAVEHAEPVYLRNNVAVK KLPGKE	231
Oranineburg Rpf AA.seq	181	LRDGEVLLPAAEDMLPIACQMF AEGKTVAVEHAEPVYLRNNVAVK KLPGKE	231
0157 rpf AA.seq	181	LRDGEVLLPAAEDMLPIACQMF AEGKTVAVEHAEPVYLRNNVAVK KLPGKE	231

*Shigella flexneri* vs 0157: 99.57%

vs *S. Oranienburg* : 84.85%

図3. 組換えRpf (rRpf) の精製

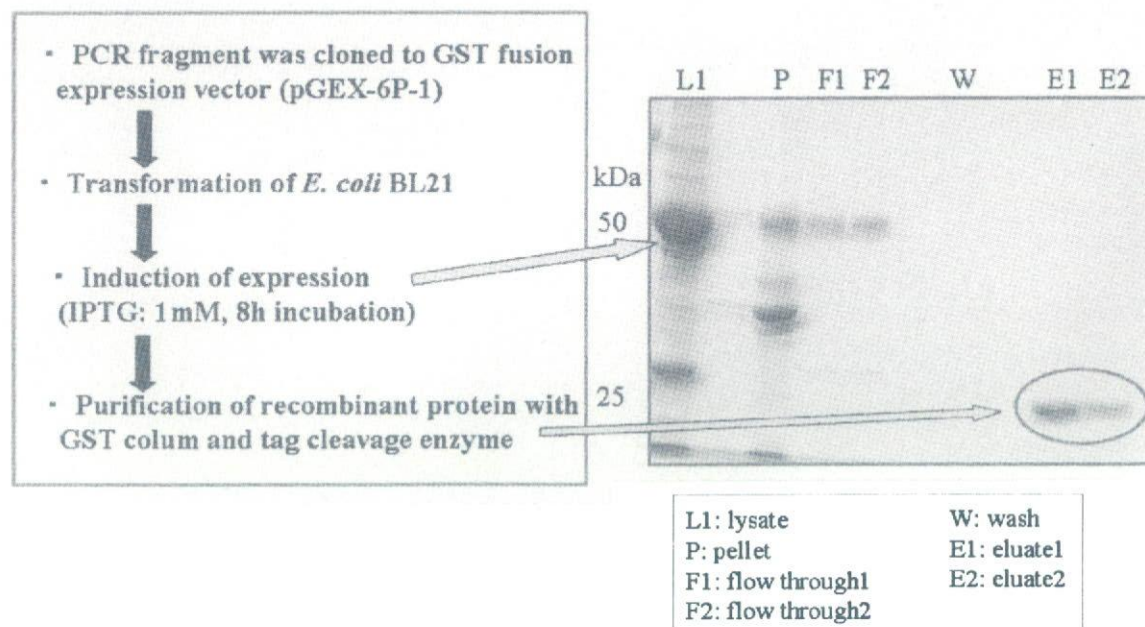
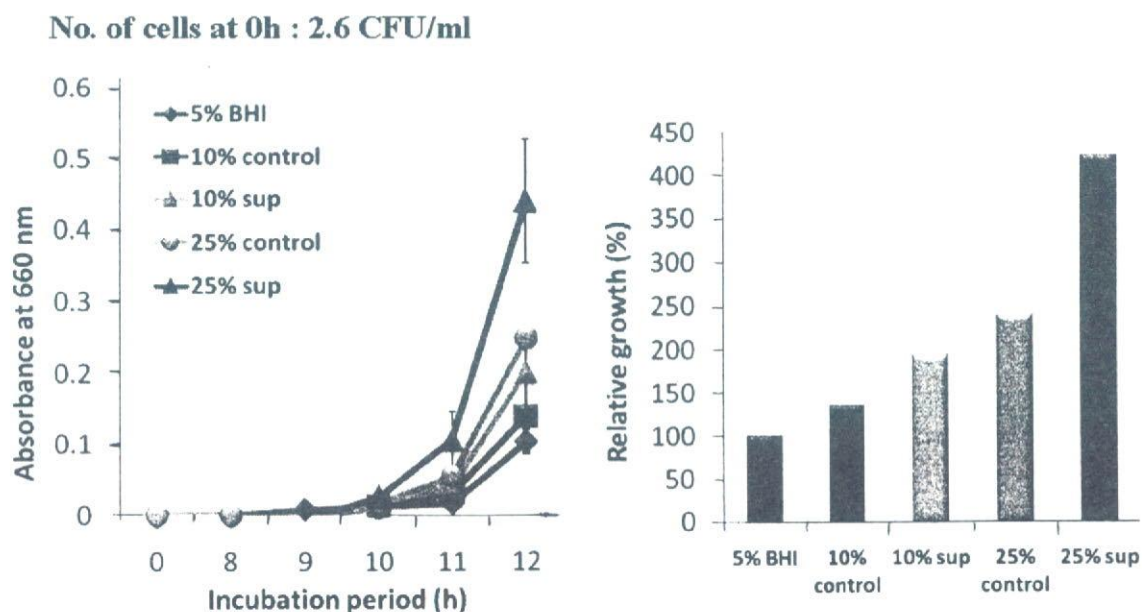


図4. 赤痢菌の増殖促進効果



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： 海外渡航者由来の赤痢菌分離株の疫学解析に関する研究

分担研究者 泉谷秀昌（国立感染症研究所 細菌第一部 第二室 室長）  
研究協力者 荒川英二、森田昌知、三戸部治郎（国立感染症研究所 細菌第一部）  
多田有希、伊藤健一郎（国立感染症研究所、感染症情報センター）  
西村聖美、竹内真人、岡村徳子（成田空港検疫所）

## 研究要旨

細菌性赤痢は、赤痢菌 (*Shigella* spp.) 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。細菌性赤痢は、感染症法において三類感染症に含まれ、確定例および無症状保菌者等の届出が義務付けられている。感染症発生動向調査によれば細菌性赤痢の発生数は年間600名前後を推移している。その推定感染地は海外が過半数を占め、また、近年の集団事例（2001年輸入カキ、2004年ハワイ便機内食）などでは輸入食品も感染源の重要な位置を占めることが示唆されている。国内散发例の報告もあるが、その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赤痢菌分離株に着目しこれらの特徴づけを行うべく、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赤痢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ので、これを報告する。

### A. 研究目的

細菌性赤痢は赤痢菌に汚染された食品や水を介して感染する。

最近の我が国における細菌性赤痢患者の発生数は年間600名前後を推移している。その大半は海外輸入例である。また、近年発生した集団事例では海外からの食品の関連が示唆されることもある。一方で、国内例は散发例がほとんどであることもあってか、原因究明にいたることはほとんどないのが現状である。そこで本研究では、まず、我が国を取り巻く赤痢菌の現状を把握することを目的とし、海外渡航者由来の赤痢菌分離株を材料に型別を行い、流行菌株を特徴づけ、そのデータバンクの構築を試みる。その上で、国内例のデータを当てはめていき、データバンク上での位置づけを検討する。

### B. 研究方法

成田空港検疫所で分離された海外渡航者由来株および2007年の国内例分離株を供試菌株とした。

型別の方法として、昨年、国際的共同研究で提唱されたパルスネット プロトコールに基づいたパルスフィールドゲル電気泳動法 (PFGE) を使用した。泳動像の解析には同じくパルスネットで利用されている Bionumerics (もしくは Fingerprinting II) ソフトウェアを使用して、コンピューターに取り込んだ泳動像の解析を行った。

### C. 研究結果

成田空港検疫所保存株 (2003年-2005年) 約200株 (渡航者由来株) および国内分離株約50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 *Xba*I であった。サイズマーカーとして *Salmonella* Braenderup H9812 株の DNA を *Xba*I 消化したものを使用した。

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。供試菌株の 8 割以上は *S. sonnei* であった。残りの 8 割が *S. flexneri* で、および *S. boydii* が残りをおさめた。渡航者由来株のクラスター解析の結果、ほぼ菌種ごとにクラスターが形成された。*S. sonnei* では比較的大きなクラスターが 2 つ、小さなクラスターが 2 つ形成された。これらは推定感染地域とある程度の相関が見られ、南アジア地域は大きいクラスターの一つ (1) に、東南アジア地域はもうひとつの大きいクラスターおよび小さいクラスターの一つ (2) に、中南米地域が別の小さいクラスター (3) に分布していた(図 1)。

国内例の疫学調査から、何例かについては海外渡航者との接触が疑われるものがあり、それらの株の PFGE クラスター解析の結果は、疫学調査のそれと一致するものもあった(図 2)。例えば、フィリピンに渡航していた人との接触があった患者からの分離株は、他のフィリピン渡航者由来株の近傍に位置づけされた。

2007 年国内例の中には渡航歴があるものも含まれており、それらの分離株の PFGE パターンは、これまでの渡航歴由来株のクラスターの中で同じ地域に関連したものに位置づけされた。

2007 年 8 月および 9 月にタイ産 Babycorn によると思われる *S. sonnei* 集団事例がデンマークおよびオーストラリアで発生した。本集団事例関連株の PFGE パターンを本研究でのクラスター解析に組み入れると、やはり、東南アジアのクラスターに位置づけられた。その近傍にはインドネシアと抗歴のある国内分離株および渡航歴のない国内分離株もあったが、PFGE パターンには若干の違いが見られた。結果的には当該 Babycorn による国内事例は確認されなかった(2008 年 1 月現在)。

2007 年 7 月に S1 県で発生した集団事例は、上記渡航歴由来株で観察された海外地域クラスターのいずれにも属さないものであることがわかり、本事例が非常にユニークな株によって発生したことが示唆された。

一方、S2 県で発生した集団事例は南アジア地域のクラスター内に位置づけされた。本事例の株の PFGE パターンにはバリエーションがありそのため、クラスター内に散在する形となった。しかしながら、他の国内例のほとんどが東南アジアクラスターに含まれることを考えると、本集団事例関連株が特異であることが示唆された。

#### D. 結論

近年発生する海外渡航歴のない細菌性赤痢の感染源はほとんど不明のままである。本研究から、赤痢菌、特に *S. sonnei* 株について南アジアなどといった非常に大きな枠ではあるものの、明確なクラスターが形成されることが明らかとなった。今後、これらの情報を活かしながら疫学調査を進めることで、原因究明の一助になることが期待される。

#### E. 研究発表

なし

#### F. 知的所有権取得状況

1 特許取得

なし

2 実用思案

なし

3 その他

なし

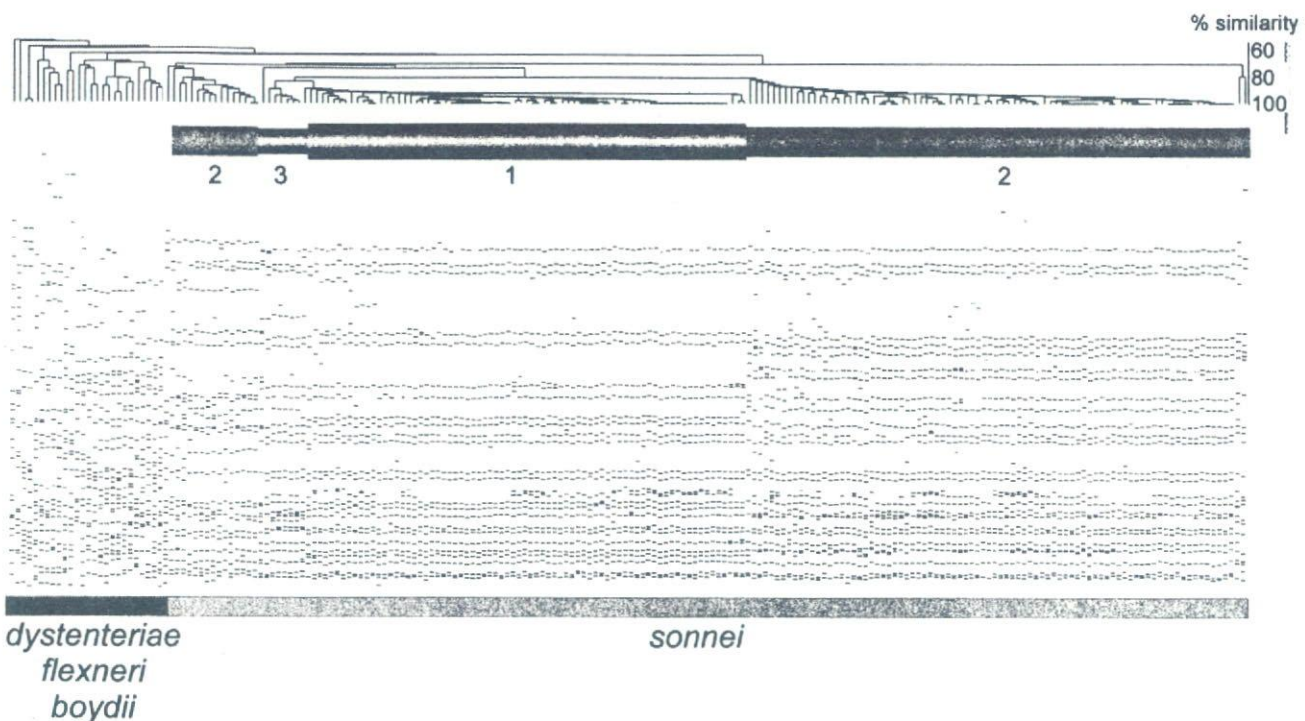


図 1. 渡航者由来赤痢菌株の PFGE クラスタ解析。渡航先に多い地域として、1、南アジア；2、中南米；3、東南アジアなどが挙げられ、それらの株が多く集積しているクラスタを番号で示した。

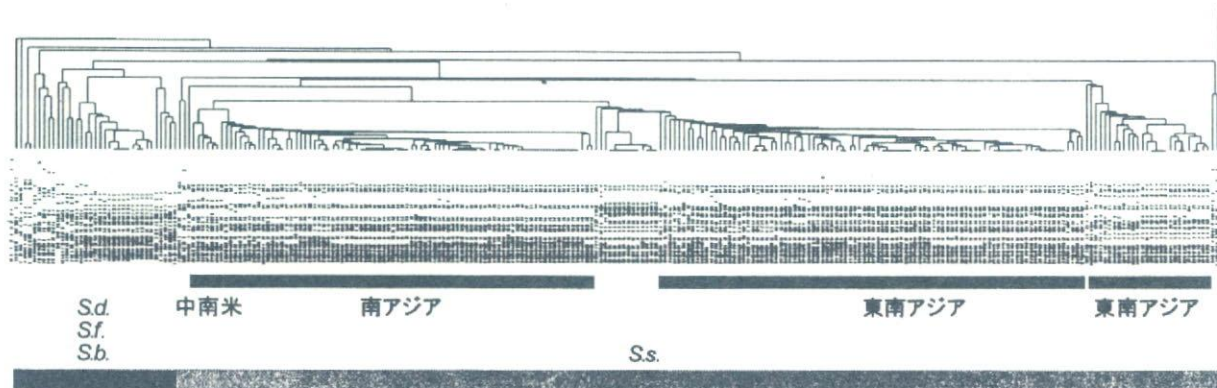


図 2. 2007 年国内例赤痢菌株の PFGE クラスタ解析。図 1 のクラスタ解析に 2007 年国内例分離株の結果を入れたもの。「渡航歴あり」、渡航歴があるもの。「接触者あり」、海外旅行に行った者と接触したもの。「Baby Corn」、文中にあるタイ産ベイビーコーン関連株。