

なお、本事例は食中毒の届出がされていないこともあり、保健所での食中毒疑い事件としての疫学調査等を行われていない。

C. PFGE の使用菌株および方法

1. 使用菌株

今回分離したヒト由来 *Yp* SGO1:3株、水系由来 *Yp* SGO1:2株、*Yp* SGO5:1株に加え、比較のため大分県衛生環境研究センター及び佐賀県衛生薬業センターの分与株 *Yp* nonSGO1-06:2株の計8株を使用した。

2. 方法

菌株は、血液寒天培地に 25°C20 時間純培養後、菌液濃度 OD=0.6 (DADE BEHRING) に調製した。

プラグは大腸菌の九州統一マニュアルに従い調製し、CDC の *Yersinia pestis* PFGE protocol に準じ、制限酵素 *Xba* I、CHEF DRIII 泳動条件、Initial A time:1.8 秒、Final A time:18.7 秒、Voltage:6.0V/cm、14°C、19 時間で実施した。

D. 結果

今回分離したヒト由来 *Yp* SGO1:3株と水系由来 *Yp* SGO1:2株の PFGE パターンは一致した。また、同時に分離した *Yp* SGO5:1株と大分県衛生環境研究センター及び佐賀県衛生薬業センターの分与株 *Yp* nonSGO1-06:2株の計3株は、それぞれ違うパターンを示した(図2)。

よって、本事例のヒトと湧水由来 *Yp* SGO1 株は、同一遺伝子型と判断した。

E. 考察

今回、湧水の下流域でのみ、ヒト由来株と同じ *Yp* SGO1 を検出した。現地調査では、水源の上部を覆った屋根に 10cm 弱の隙間を認め、外部から小動物の侵入は否定できない構造となつて

おり、さらに下流域には、小動物の侵入や汚水の浸淫するような箇所は認めなかった。また、患者家族らは、5年前から同地に居住し、同じ湧水を使用してきたが、これまでに健康被害はなかったと言う。これらのことから、今回一過性に湧水が汚染されたと推察され、事例発生から水系試料採取までに日数を要したことが、水源で *Yp* SGO1 を分離できなかった要因と考えられた。しかしながら、水路の上流域で *Yp* SGO5 を検出したことは、断続的に *Yp* 汚染が起きている可能性も示唆された。

湧水の *Yp* 汚染が原因で今回の事例が発生したことは特定できたが、湧水の汚染源の一つとして疑った小動物(野鼠1匹の便と直腸)から *Yp* を分離できなかったため、その汚染源がどこに存在していたのか明確にできなかった。

一方、PFGE パターンは、20 から 150kbp 付近に集中してややスメア状に切断パターンが観察された。同時に処理したマーカーの *Salmonella* Braenderup H9812 株パターンは問題ないことから、ProtenaseK や *Xba* I などの酵素試薬系は正常に作用したと考えられた。

これと似た現象を熊本県保健環境科学研究所らと共同で行った既報『*Campylobacter jejuni* 分子疫学解析の検討』の中で、カンピロバクターはプラグ作製前の菌の不活化(63°C10min)によって PFGE パターンがスメア状になりやすいことを報告したが、*Yp* も同様なのか、あるいは菌液濃度が濃かったのか、*Xba* I 反応時間は適正だったかなど、今回の報告では検討していない。

また、*Yp* など、ごく希にしか分離されない菌種について、同じ血清型でも、どの程度 PFGE パターンに多様性があるのか課題も残った。

F. 結論

Yp の感染源を PFGE で特定でき、その有用

性を確認した。しかし、鮮明な泳動パターンを得るために、*Y.p* に適応した PFGE protocol を検討する必要性を感じた。

水系感染の場合、感染時と同じ状態で感染

源が保持されていないため、疫学調査や検体確保など、迅速な対応が望まれる。

G. 研究発表

なし

表1 患者家族の概要と検査結果

採便日	性	年齢	発症日時	症 状	<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>
11月14日	M	49		無	陰 性
	F	48		無	陰 性
11月19日	F	19		無	陰 性
	F	18	11/14 12時	発熱, 不定型発疹, 手掌・足底紅斑(膜様落屑) その他(軽度下痢, 腹痛, 嘔吐)	陽 性 (SGO1)
	F	16		無	陽 性 (SGO1)
11月14日	M	14		無	陰 性
	M	11	11/7 20時	川崎病診断基準を満たす(継続的発熱以外) その他(軽度下痢)	陰 性
	M	9		無	陰 性
11月11日	F	7	11/10 14時	川崎病診断基準を満たす(継続的発熱以外) その他(重度下痢, 嘔吐, 意識障害)	陽 性 (SGO1)
11月14日	F	5	11/7 7時	川崎病診断基準を満たす(継続的発熱以外) その他(軽度下痢)	陰 性

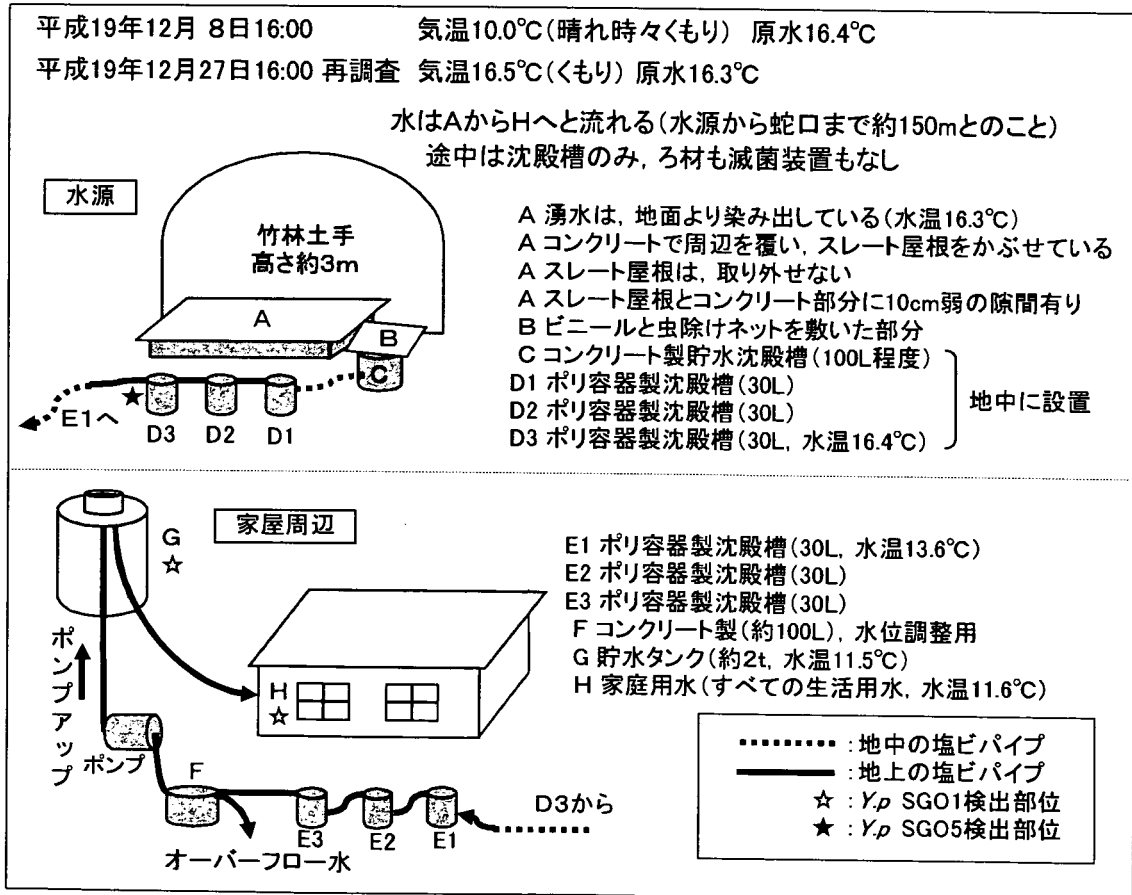


表2 環境検体の検査結果

採取日	検体名	大腸菌群	大腸菌	一般細菌数	<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>
12月5日	E1上清(1L, 無色透明)	(+)	(+)	202	陰性
	E1底の茶色沈殿物を含む水(1L)	(+)	(+)	19,800	陰性
	E1底に生息していたトビケラ1匹(体長約1cm, 川に生息する虫)	実施せず	実施せず	実施せず	陰性
12月8日	D3の上清(1L, 無色透明)	(+)	(+)	43	陽性(SG05)
	D3の沈殿を浮遊させた濁り水(1L, 茶色微細粒子沈殿物)	(+)	(+)	3,500	<i>Y. enterocolitica</i> nonO1-O9
	Gの上清(1L, 無色透明)(内部に沈殿・浮遊物なし)	(+)	(+)	27	陽性(SG01)
	H台所用水(1L, 無色透明)	(+)	(+)	18	陽性(SG01)
	湧水周辺湿地帯の水(50ml, 無色透明, 土混入)	実施せず	実施せず	実施せず	陰性
	B上の土(約20g, 落ち葉下の腐葉土)	実施せず	実施せず	実施せず	陰性
	竹林土手の土(約20g, A直上, 苔の混ざった土)	実施せず	実施せず	実施せず	陰性
12月27日	Aの砂混じりの水(原水, 200ml)	(+)	(+)	実施せず	<i>Y. enterocolitica</i> nonO1-O9
	Aの砂(約5g)	実施せず	実施せず	実施せず	<i>Y. enterocolitica</i> nonO1-O9
	D2の水(1L)	(+)	(+)	実施せず	陰性
	湿地帯の水(50ml)	実施せず	実施せず	実施せず	陰性
12月28日	野鼠(ヒメジ)の便(トラップ内)	実施せず	実施せず	実施せず	陰性
	野鼠直腸内容物(上と同一野鼠)	実施せず	実施せず	実施せず	陰性

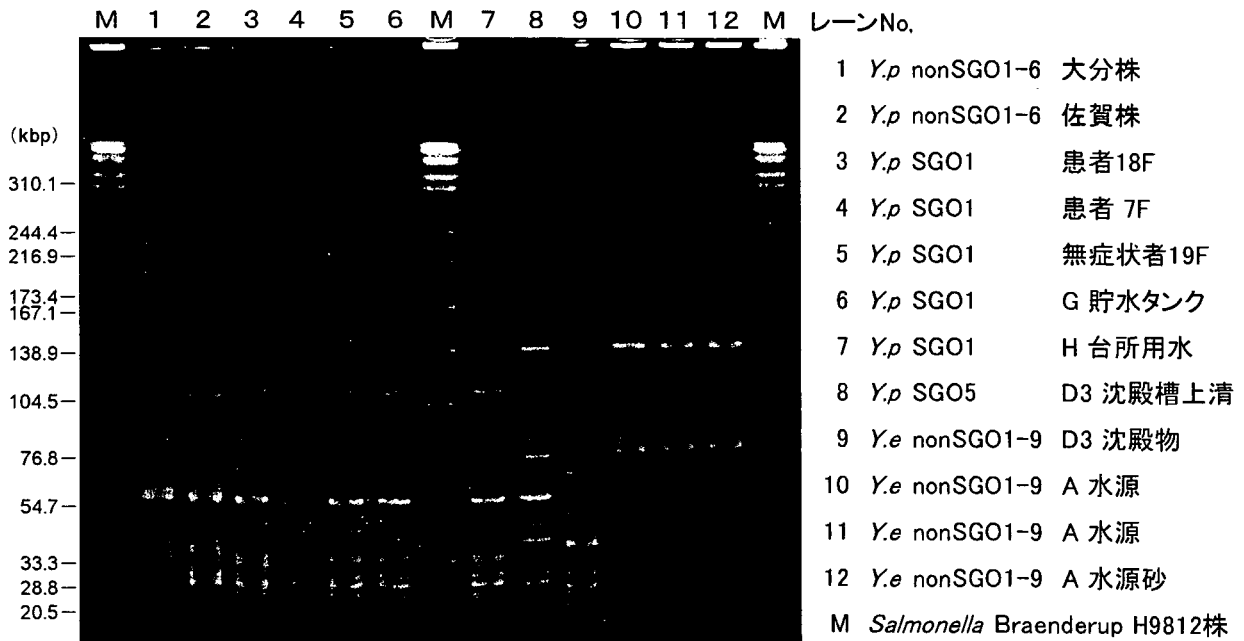


図2 PFGE 泳動像

厚生労働科学研究費補助金(新興・再興感染症 研究事業)
分担研究報告書

3 施設へ拡大した腸管出血性大腸菌 O111 による集団発生事例

研究協力者 大分県衛生環境研究センター微生物担当

緒方喜久代 成松浩志 若松正人 長岡健朗 小河正雄 吉用省三 瀧祐一

研究要旨

平成 19 年 5 月に大分県内の幼稚園で EHEC O111:HNM(VT1&2)による集団感染事例が発生した。接触者検便の結果、幼稚園児の複数家族から同型菌が検出された。菌陽性者には保育園児と小学生が含まれていたため、小学校の全員検便を含め 830 名の検便を実施した。最終的には、3 施設の園児・学童 23 名とその家族等 8 名の合計 31 名から当該菌が検出された。分離菌株について、制限酵素 *Xba* I を用いたパルスフィールド電気泳動 (PFGE) を実施したところ、いずれもよく似た PFGE パターンを示し、同一菌株由来の集団発生であることが示唆された。感染源は特定できなかったが、幼稚園で園児同士の直接的な接触を通じて感染が拡がり、感染園児から各家庭へ、感染家庭から保育園、小学校へと感染拡大したものと推察された。

A. 研究目的

感染源を特定するため疫学調査や接触者検便、拭き取り検査等を行うとともに、3 施設およびその家族の糞便から分離された EHEC O111:HNM(VT1&2)について、分離株の異同を調べるため PFGE 解析を行った。

B. 研究方法

1. 分離および同定

糞便検査の直接分離培養は、CT・ソルボース MAC 寒天培地、クロモアガー O157 培地、DHL 寒天培地を使用し、TSB 培地による増菌培養も併用した。DHL 寒天培地からの Sweep 法、または TSB 増菌液を用いて、PCR 法により VT 遺伝子の検索を行った。ふき取り検体は TSB 増菌培養後、PCR 法で

VT 遺伝子を検索するとともに、免疫磁気ビーズ法で集菌し、さらに TSB 増菌培養後 PCR 法で VT 遺伝子の検索を行った。

PCR 法で VT 遺伝子陽性となった検体の分離平板上の疑わしい集落について LIM 培地、XM プロス、普通寒天平板を用いて精査した。当該菌が有する LIM 培地でリシン(-)・インドール(+)-運動(-)、XM プロスで GAL(+)-MUG(-)-インドール(+)-の生化学的性状と普通寒天からの血清凝集反応で判別を行った。当該菌が疑われる分離株については、PCR 法で VT 遺伝子および VT 型別を実施した。

2. PFGE 法

平成 15 年度に示された国立感染症研究所新プロトコールを基本に、供試菌株を制限酵素 *Xba* I で 37°C 16 時間消化後、CHEF

DRⅢ (Bio·Rad)を使用し、電圧 6V/cm、スイ
ッチタイム 22.2-54.2 秒、12°Cで 20 時間電
気泳動を行った。サイズマーカーは
Salmonella Braenderup H9812
PulsNet Standard Strain を供試菌株と
同様に処理をして用いた。

C. 研究結果

1. 事件の概要

平成 19 年 5 月 26 日に EHEC O111(こ
の時点では VT 陽性のみで型別は不明)が下
痢症患者から検出された旨、O 市保健所に医
療機関から届出があった。患者が居住する管
轄保健所の調査で、患者は幼稚園に通園し
ていることが判明したため、同市教育委員会
等と協議のうえ、翌日から幼稚園への健康調
査と衛生指導を開始した。31 日には当該幼
稚園児 5 名より当該菌が検出され、集団発生
が明らかとなったため、県は保健所緊急支援
チームの派遣を行った。接触者検便で幼稚
園児の複数家族から当該菌が検出され、検
出者には保育園児と小学生がいることも判明
した。6 月 5 日に県庁内に感染症対策本部が
設置され、小学校関係者 500 名以上の全員
検便を決定、実施した。

また、初感染の児童が治療終了後、2 回に
わたり再排菌を繰り返したため、終息宣言は
最終陰性確認が終了した 7 月 6 日となった。

2. 分離状況

830 名の検便を実施した結果、最終的には
幼稚園児 13 名、保育園児 3 名、小学生 7 名、
幼稚園児の 5 家族 8 名の合計 31 名から当該
菌が検出された。施設別の検出率は幼稚園

18%、保育園 2.8%、小学校 1.5%の順であ
った。

なお、当該幼稚園、小学校等の拭き取り検
査を実施したが、当該菌は検出されなかつ
た。

3. PFGE 型別

分離菌株の PFGE パターンはいずれもよく
一致しており、同一菌株由来と推察された(図
1)。

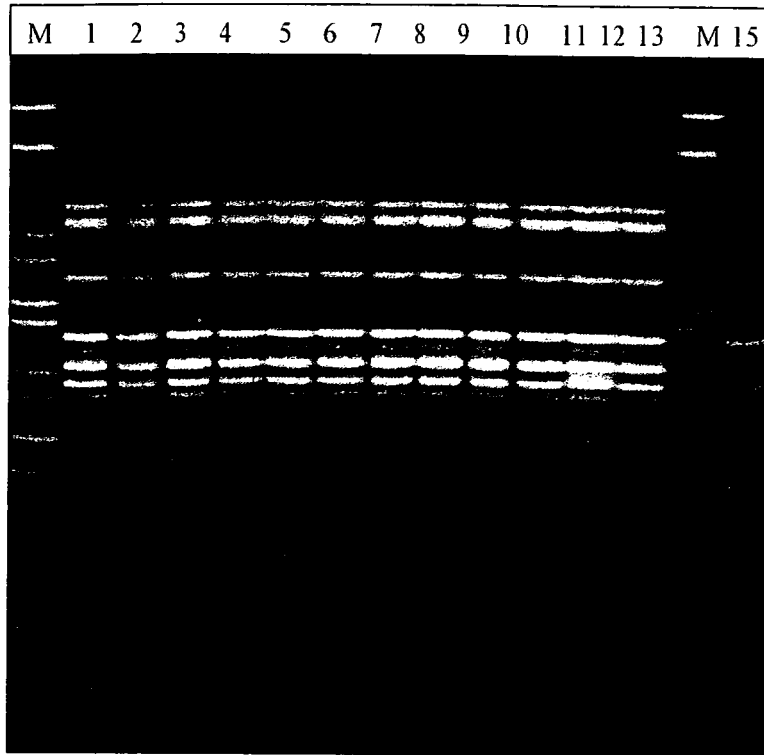
D. 考察

初発患者を含め、患者が多発した幼稚園
では給食等を供しておらず、拭き取り検査な
どからも感染源は特定できなかったが、分離
菌株について実施した PFGE では、いずれも
よく似た PFGE パターンを示し、同一菌株由
来の集団発生であることが示唆された。まず
幼稚園で園児同士の直接的な接触を通じて
感染が拡がり、感染園児から各家庭へ、感染
家庭から保育園、小学校へ感染拡大したもの
と推察された。小学校等の感染者は、同一ク
ラスや交流が頻繁な学童間に限定されており、
学校や園のトイレ等を介した感染ではなく、幼
稚園同様に感染者との直接的な接触を通し
て二次感染したものと考えられた。

E. 研究発表

なし

図1



S. Braenderup(H9812)

2.大分07004:今回の集団発生株

3.大分07007:今回の集団発生株

4.大分07008:今回の集団発生株

5.大分07009:今回の集団発生株

6.大分07011:今回の集団発生株

7.大分07015:今回の集団発生株

8.大分07017:今回の集団発生株

9.大分07019:今回の集団発生株

10.大分07024:今回の集団発生株

11.大分07026:今回の集団発生株

12.大分07029:今回の集団発生株

13.大分07030:今回の集団発生株

S. Braenderup(H9812)

15.大分00029:以前分離した保存株

厚生労働科学研究費補助金(新興・再興感染症 研究事業)
分担研究報告書

2007年9-10月に発生した *Salmonella* Enteritidis による2例の集団事例、および
同時期に発生した散発事例について

研究協力者 河野喜美子 宮崎県衛生環境研究所

要旨 2007年9~10月、宮崎県において、2事例の *Salmonella* Enteritidis 集団事例が発生した。また、同時期に、本菌による散発事例も発生している。各事例の分離菌について、パルスフィールドゲル電気泳動法(PFGE)による遺伝子型およびファージ型を調べた結果、集団事例の2事例については、それぞれ異なる起源の *Salmonella* Enteritidis により発生したことが確認された。しかし、集団事例1事例と散発事例1事例からの各分離菌が、PFGE 遺伝子型およびファージ型ともに一致していたことから、これらの事例は、当時流通していた食品によるDiffuse outbreak である可能性も考えられた。

A. 研究目的

2007年9月~10月、宮崎県において、2事例の *Salmonella* Enteritidis 集団事例が発生した。また、同時期に、本菌による散発事例も発生している。各事例の発生原因究明のため、さらにこれらの事例間の感染源・感染経路における関連の有無を調べるため、分離菌について、パルスフィールドゲル電気泳動法(PFGE)による遺伝子型およびファージ型を調べ、これらを比較解析した。

B. 研究方法

1. 材料

1) 集団事例1

2007年9月30日、保育園で発生した集団事例について疫学調査および検査を実施した。検査は、患者便3検体、9月27日の昼給食8食品(検食)、28日のおやつ2食品(検食)、29日の昼給食5食品(検食)、

計18検体について実施した。

2) 集団事例2

2007年10月12日、病院内で発生した集団事例において、入院患者、病棟職員、医師、給食担当職員の検便(発生病院内の検査室で検査されたため、詳細は不明)、および10月9、10、11日の給食(朝、昼、夕食)の検査が実施された。本研究では、これらの検査によって分離された *Salmonella* Enteritidis 患者分離株5株および疫学調査資料を用いた。

3) 散発事例

2007年3月から10月に宮崎県内で発生した散発下痢症事例から、民間検査室によって分離された *Salmonella* Enteritidis 菌株7株および患者に関する調査資料を用いた。

2. 食中毒細菌の分離同定方法

集団事例1において、便および食品からの食中毒細菌の分離同定方法は常法に準

じて実施した。集団事例 2 および散発事例についての検査は、発生施設および民間検査施設で実施されたため、検査の詳細は不明である。

3. PFGEによる遺伝子解析

PFGEの方法は、国立感染症研究所の方法を基に作成した「大腸菌のパルスフィールドゲル電気泳動法による解析 九州ブロックマニュアル(2005)」に準拠して行った。ただし、制限酵素は、*Bln* 1(ロッシュ)、*Xba* 1(ロッシュ)を使用し、泳動は、1%アガロース(SeaKem Gold Agarose、CAMBREX)により、電圧 6v/cm、パルスタイム 5.0~50.0秒、バッファー温度 14°C、泳動時間 22時間の条件で行った。

4. *Salmonella* Enteritidis のファージ型別

国立感染症研究所細菌第一部により実施された。

C. 研究結果

1. 事例の概要

1) 集団事例 1

2007年9月30日から10月2日に、保育園の園児 16名が、下痢、発熱、腹痛を主症状として発症した。患者および食品検体を検査した結果、検査を実施した患者 3名および、食品 15検体中、9月27日の昼給食の生野菜(トマトおよびレタス)、きざみみかん、9月29日の昼給食のつぶしたごはんから *Salmonella* Enteritidis が検出された。卵は9月27日にコロケ、かき玉汁に使用されていたが、これらの食品から *Salmonella* Enteritidis は検出されていない。さらに、患者分離菌と食品分離菌の PFGE 遺伝子型、ファージ型が同一であったことから、これらは同一起源の菌であると推定された。以上

のことから、本事例は、調理室内が *Salmonella* Enteritidis により汚染されていたため、そこで調理した食品が汚染されて発生した集団食中毒であると推定した(表 1)。

2) 集団事例 2

同一病棟に入院(他の病気のため)していた5名が、2007年10月9日~13日に、下痢等を発症した。検査の結果、5名全員から *Salmonella* Enteritidis が検出され、さらに、これらの5株は同一の PFGE 遺伝子型、ファージ型を示した。これらことから、本事例は同一起源の菌による集団事例であると考えられた。病棟職員、医師、給食担当職員の検便(病院の検査室で検査)、10月9、10、11日朝、昼、夕食の検査(保健所で検査)が実施されたが、*Salmonella* Enteritidis は検出されず、感染源、感染経路は不明となった(表 2)。

3) 散発事例

2007年3月から10月に、宮崎県内で発生した、*Salmonella* Enteritidis を原因とした散発事例7例の概要は表3に示すとおりである。

1)2)3)の事例で検出された *Salmonella* Enteritidis のリストおよびその由来等を表3に示した。

2. 各事例間での PFGE 遺伝子型の比較

集団事例2事例の分離菌は互いに異なる PFGE 遺伝子型を示した。また、散発事例7事例の分離菌は、それぞれ、異なった遺伝子型を示したが、10月に発生した散発事例-7の分離菌は集団事例1の原因菌と同一の遺伝子型を示した。

3. 事例間でのファージ型の比較

集団事例2事例の分離菌は互いに異なる

ファージ型を示した。散発事例 7 事例の分離菌は、5 種類のファージ型を示したが、このうち、10月に発生した散発事例-7の分離菌のファージ型は 47 であり、集団事例1の分離菌と同一の型であった。

D. 考察

宮崎県では、2007年のほぼ同時期に、2例の *Salmonella* Enteritidis による集団事例が発生し、さらに、*Salmonella* Enteritidis による散発事例も同時期に発生していたことから、当初、これらの事例が、共通の感染源により発生した Diffuse outbreak である可能性も考えられた。しかし、集団事例の 2 事例からの分離菌は、PFGE 遺伝子型およびファージ型ともに異なっていたため、これらは異なる感染源に由来することが確認された。ただし、10月に発生した、散発事例中の 1 事例と集団事例の 1 事例の分離菌が、PFGE パターンおよびファージ型ともに一致していたことは、この頃に流通していた食品による Diffuse outbreak であった可能性もある。

今回、事例の感染源推定のため、まず、分離菌の PFGE 遺伝子解析を実施したが、集団事例-1および散発事例-7の分離菌の PFGE 遺伝子型は、多くの *Salmonella* Enteritidis 株が示す型であったため(データ未掲載)、PFGE 遺伝子型だけでは菌株間の異同を明確にできなかった。そのため、

今回の事例では、ファージ型の結果をも併せて、比較解析を行った。このように、*Salmonella* Enteritidis による事例では、PFGE 遺伝子型だけで判定できない場合もあり、ファージ型、その他の疫学的解析も併せて実施する必要がある。

E. 結論

2007年9-10月に発生した、*Salmonella* Enteritidis による集団事例 2 事例、および同時期に発生した散発事例の原因菌について、PFGE 遺伝子型、ファージ型を比較したところ、集団事例の 2 事例については、それぞれ異なる起源で発生したことが証明された。また、散発事例中 1 事例の分離菌と集団感染事例の分離菌が一致したことから、この頃流通していた食品による Diffuse outbreak の可能性も考えられた。

F. 研究発表

無し

謝辞 ファージ型別試験をしていただいた、国立感染症研究所 細菌第一部 泉谷秀昌先生に深謝します。また、疫学調査および検査結果を提供して下さった、日向保健所、都城保健所の皆様に感謝します。

表1 集団事例1の概要

発生地	宮崎県日向市
発生場所	保育園
発生日	2007年9月30日～10月2日 13日
患者数	16名(1～6歳)
検出菌	<i>Salmonella</i> Enteritidis
菌検出数	患者:3/3
/検査数	食品:3/18
	{ 9/27 生野菜、きざみミカン、 9/29 つぶしたごはん
主な症状	下痢(3～40回),発熱(37～40℃),腹痛
原因食品	9月27日、29日の給食(特定できず)

表2 集団事例2の概要

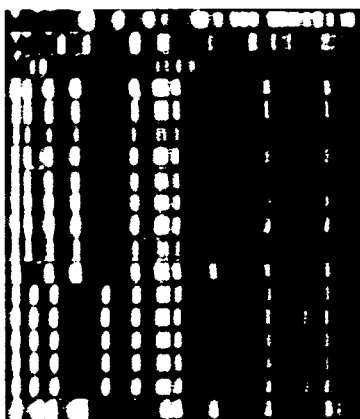
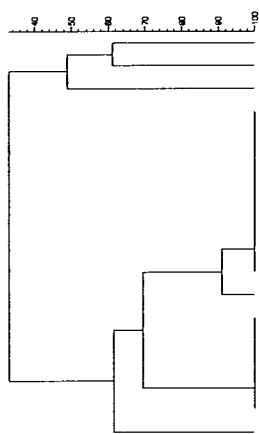
発生地	宮崎県都城市
発生場所	病院
発生日	2007年10月9日～10月
患者数	5名(63～86歳)
検出菌	<i>Salmonella</i> Enteritidis
菌検出数	患者:5/5
主な症状	下痢、腹痛、吐き気、嘔吐
原因食品	不明

表3 *Salmonella* Enteritidis が検出された検体に関する情報

事例	検体No	分離地(宮崎県)	分離日(2007)	分離材料	検体提供者			
					性別	年齢	発病日	症状
集団事例1	1	日向市	10.9	便	男	6	2007.9.30	下痢、発熱38.0℃
	2	日向市	10.9	便	男	4	2007.10.1	下痢、発熱38.0℃
	3	日向市	10.23	便	男	5	2007.10.2	下痢、発熱39.0℃
	4	日向市	10.16	9.27給食食品 生野菜(トマト、レタス)				
	5	日向市	10.16	9.27給食食品 きざみみかん				
	6	日向市	10.16	9/29給食食品 ごはん(つぶしたもの)				
集団事例2	7	都城市	10.13	便	男	66	2007.10.13	下痢
	8	都城市	10.12	便	男	71	2007.10.12	下痢
	9	都城市	10.12	便	男	86	2007.10.11	下痢、吐気
	10	都城市	10.12	便	男	63	2007.10.	下痢
	11	都城市	10.13	便	女	79	2007.10.9	下痢、腹痛、吐気、嘔吐
散发事例	12	都城市	3.29	便	女	0	2007.3.22	下痢
	13	宮崎市	4.18	便	男	6	2007.4.	下痢
	14	宮崎市	5.18	便	男	5	2007.5.	下痢
	15	宮崎市	6.21	便	男	9	2007.6.	下痢
	16	都城市	7.25	便	男	9	2007.7.23	下痢、発熱
	17	宮崎市	10.9	便	女	7	2007.10.	
	18	宮崎市	10.24	便	女	1	2007.10.22	脳症、発熱(41.1℃)、熱性けいれん 下痢、血便、吐気、嘔吐

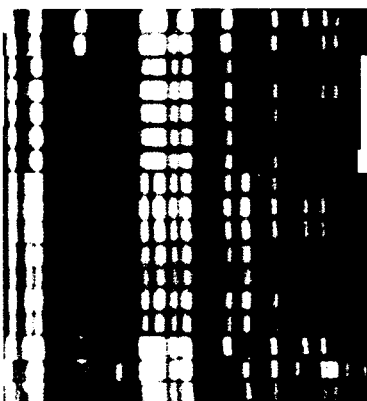
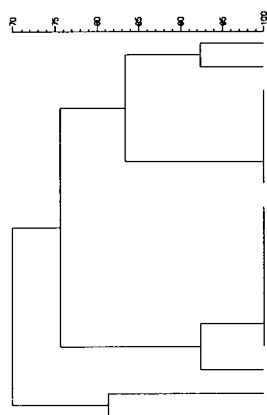
図1. *Salmonella* Enteritidis 分離株のPFGEパターン

1) *Bln* I



由来	制限酵素	ファージ型	分離日	年齢
散発事例-1	BlnI	6a	2007.3.29	0歳
散発事例-3	BlnI	3	2007.5.18	5歳
散発事例-6	BlnI	21	2007.10.9	7歳
散発事例-4	BlnI	14b	2007.6.21	9歳
集団事例1-患者-2	BlnI	47	2007.10.9	4歳
集団事例1-食品-C(ご飯)	BlnI	47		
集団事例1-患者-3	BlnI	47	2007.10.23	5歳
散発事例-7	BlnI	47	2007.10.24	1歳
集団事例1-患者-1	BlnI	47	2007.10.9	6歳
集団事例1-食品-A(生野菜)	BlnI	47		
集団事例1-食品-B(みかん)	BlnI	47		
散発事例-5	BlnI	6a	2007.7.25	9歳
集団事例2-患者-1	BlnI	4	2007.10.13	66歳
集団事例2-患者-2	BlnI	4	2007.10.12	71歳
集団事例2-患者-3	BlnI	4	2007.10.11	86歳
集団事例2-患者-4	BlnI	4	2007.10.12	63歳
集団事例2-患者-5	BlnI	4	2007.10.13	79歳
散発事例-2	BlnI	6a	2007.4.28	6歳

2) *Xba* I



由来	制限酵素	ファージ型	分離日	年齢
散発事例-2	XbaI	6a	2007.4.18	6歳
散発事例-5	XbaI	6a	2007.7.25	9歳
集団事例2-患者-1	XbaI	4	2007.10.13	66歳
集団事例2-患者-2	XbaI	4	2007.10.12	71歳
集団事例2-患者-3	XbaI	4	2007.10.11	86歳
集団事例2-患者-4	XbaI	4	2007.10.12	63歳
集団事例2-患者-5	XbaI	4	2007.10.13	79歳
集団事例1-患者-1	XbaI	47	2007.10.9	6歳
集団事例1-患者-2	XbaI	47	2007.10.9	4歳
集団事例1-食品-A(生野菜)	XbaI	47		
集団事例1-食品-B(みかん)	XbaI	47		
集団事例1-食品-C(ご飯)	XbaI	47		
集団事例1-患者-3	XbaI	47	2007.10.23	5歳
散発事例-7	XbaI	47	2007.10.24	1歳
散発事例-4	XbaI	14b	2007.6.21	9歳
散発事例-1	XbaI	6a	2007.3.29	0歳
散発事例-3	XbaI	3	2007.5.18	5歳

ミドリガメが感染源と考えられる小児サルモネラ感染事例

研究協力者 長崎市保健環境試験所

海部春樹 飯田國洋 植木信介 島崎裕子 江原裕子

要 旨 2005年11月に長崎市保健所へ届けがあったミドリガメが感染源と考えられたサルモネラ腸炎の症例について報告する。

A. 研究目的

ミドリガメ等爬虫類においては、サルモネラ菌の保菌率が高いことが知られている。高齢者・小児では重症化しやすく、爬虫類の飼育には、十分な知識と慎重な対応が必要である。

当初、食品由来感染症として調査された事例であるが、詳細な聞き取り調査により、ミドリガメを飼育していることが判明し、カメからの病原菌の検出と、分離されたサルモネラのPFGEを実施したので報告する。

B. 研究方法

①ミドリガメからの病原菌の検出

カメの体の洗浄液、飼育水槽フィルター残水を検体とした。遠心をして集菌を行い、前増菌培養(緩衝ペプトン)、増菌培養(RV)後、SS・BTB培地で分離を試みた。

②PFGE法

制限酵素はBln I とXba I を用い、大腸菌のパルスフィールドゲル電気泳動法による解析(九州ブロックマニュアル)に準じて行った。泳動条件は電圧6V/cm、パルスタイム2.2~54.2秒、泳動時間19時間で実施した(図1)。

C. 研究結果

市内総合病院より、6歳男児が腹痛・発熱(40度)・下痢症状の急性胃腸炎で入院、検便からサルモネラO4群が検出されたという報告を受け、菌株のH型別検査を実施し、*Salmonella* Schleissheimと同定した。また、この患児がミドリガメを飼育していたとの聞き取り情報から、カメの体の洗浄液及び飼育水槽のフィルター残水について検査を実施した。カメの体の洗浄液からサルモネラO4群とO8群を、水槽残水からサルモネラO4群を検出した。このO8群は *Salmonella* Litchfield、同時に検出したO4群については、*Salmonella* Schleissheim と同定された。また、上記の *Salmonella* Schleissheim 3株について PFGE 解析を実施したところ、3株すべて同一のパターンを示した。さらに、薬剤感受性試験も、3株とも同一の結果となった。

E. 結論

本事例がミドリガメに起因するサルモネラ腸炎であることが推察された。原因となったミドリガメ(アカミガメ)は年間数十万匹から百万匹が日本国内に

輸入されており、日本で最も普通に飼育されているカメ類である。近年のペットブームに伴い、多種多様なペットが、家庭内で飼育されるようになり、動物由来感染症はますます増加することが予想される。感染症発生時においては、食品とともに動物も念頭においた、疫学調査を実施することが重要である。

F. 研究発表

病原微生物検出情報Vol.27 No3(2006.3)

Jpn.J.Infect.Dis.,59,2006.

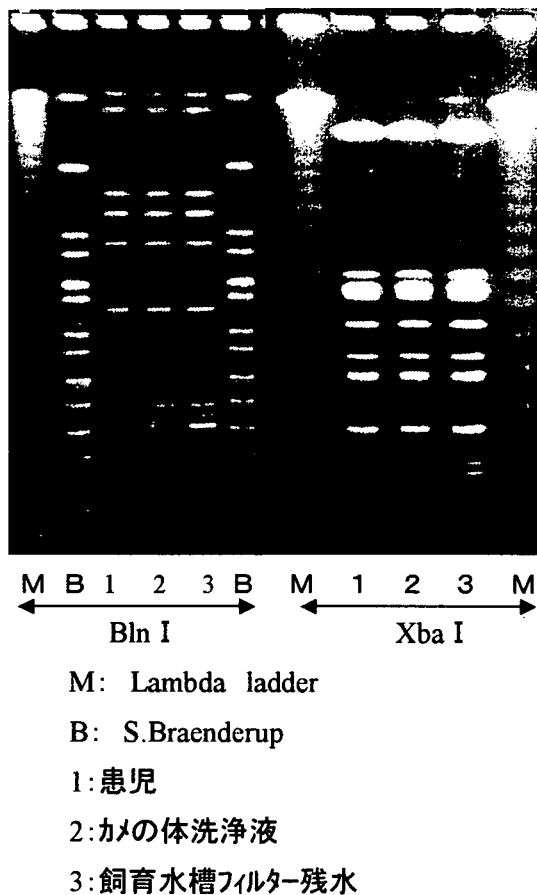


図1 *Salmonella* Schleissheim 分離株の PFGE パターン

足湯浴槽の清掃が原因と考えられたレジオネラ症の事例報告

協力研究者 鹿児島県環境保健センター 微生物部

蓑田祥子 上野伸広 松山茂樹 本田俊郎 石谷完二 藏元 強

要 旨

2007年9月、レジオネラ症患者の届出があった。保健所による疫学調査が実施され、感染の原因として疑われた環境検体が当センターに搬入された。検査の結果、患者が清掃に参加していた足湯施設の浴槽水から、*Legionella pneumophila* SG1(以下、*L. p* SG1)が検出された。後日、医療機関で分離された患者喀痰由来 *L. p* SG1 株と当センターで分離した足湯浴槽水由来 *L. p* SG1 株の PFGE 解析を実施したところ、パターンが一致したため、本症例は足湯施設の清掃時に感染したと考えられた。

A. 概要

2007年9月、レジオネラ症患者の届出があった。

患者は58歳男性、糖尿病の既往があり、喫煙、飲酒の習慣があった。8月30日より発熱を認め、近医受診。その後も発熱、肺炎症状等が持続したため転院。9月4日尿中抗原の検出によりレジオネラ症と診断された。

保健所による疫学調査の結果、患者宅は天然温泉を使用していたこと、8月22日にボランティアで足湯施設の清掃に参加していたことが判明した。このことから、9月10日、感染の原因として考えられた患者宅浴槽水と足湯施設に関連する2検体(足湯浴槽水、足湯源泉)の計3検体が当センターに搬入され、レジオネラ属菌、アメーバの検査を実施した。

検査の結果、患者宅浴槽水、足湯源泉からレジオネラ属菌は検出されなかったが、足湯

の浴槽水から *L. p* SG1 180cfu/100ml と *Legionella* spp. 160cfu/100ml が検出された。アメーバについては3検体とも検出されなかった(表1)。

後日、医療機関で患者喀痰から分離された *L. p* SG1 株と足湯浴槽水由来 *L. p* SG1 株の PFGE を実施した。

B. 材料と方法

1. 供試菌株

医療機関から分与を受けた患者由来 *L. p* SG1 1株、当センターで分離した足湯浴槽水由来 *L. p* SG1 2株、比較対照として県内の他の温泉施設から分離された *L. p* SG1 9株を使用した。

2. レジオネラ属菌の PFGE

レジオネラ属菌のパルスフィールド・ゲル電気泳動 九州ブロック統一マニュアルの Lysozyme

処理を省略して実施した。制限酵素は *sfi* I を使用した。

D. 結果

患者由来 *L. p* SG1 株と足湯浴槽水由来 *L. p* SG1 株の PFGE パターンは一致し、比較として使用した他の温泉由来 *L. p* SG1 9 株はすべて異なるパターンを示した (図 1)。

E. 考察

患者由来 *L. p* SG1 株と足湯浴槽水由来 *L. p* SG1 株の PFGE パターンが一致したことと疫学調査から、この患者のレジオネラ症感染は足湯浴槽の清掃が原因と考えられた。

さらに後日、当センターにおいて再調査を実施したところ、足湯浴槽水、浴槽内の数カ所の拭き取り検査でレジオネラ属菌、アメーバ、大腸菌等を検出し、バイオフィーム付着程度の目安となる ATP 値も高値を示した (表 2)。

この足湯施設は市の温泉施設から配湯される掛け流し式で、浴槽に塩素剤等は使用していなかった。入湯者は 1 日に 50~60 人以上と、無料開放施設の特性から正確な人数は把握できていない。毎日午後 11 時に湯の供給は停止され、排水せずにそのまま翌朝の配湯開始まで放置されていた。清掃はボランティア団体により週に 2~3 回、主としてブラシでの清掃を実施していたが、当該患者は今回高压洗浄機を使用し、マスク等の着用はしていなかった。

このことから、本症例は足湯浴槽清掃時に発生したエアロゾルを吸い込んだことによる感染と推察された。

E. 結論

患者由来 *L. p* SG1 株と足湯浴槽水由来 *L. p* SG1 株の PFGE 解析の結果、本症例は足湯施

設の清掃時に感染したものと考えられた。

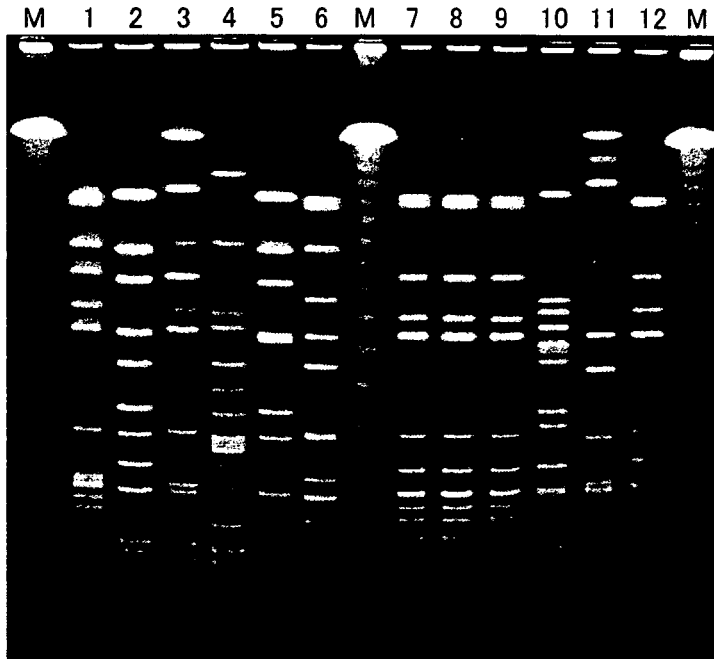
現在、足湯施設に関しては管理基準等が定められておらず、管理は施設ごとに様々である。足湯ブームと言える昨今、このような事例発生を防止するためにも、今後足湯の実態調査を行い、管理基準等について整備する必要があると考える。

F. 発表

久保園祥子、上野伸広、石谷完二、本田俊郎、松山茂樹、藏元 強、宮田義彦：足湯浴槽の清掃が原因と考えられたレジオネラ症の 1 例、病原微生物検出情報、29(2)、15-16、2008

表1 環境由来検体の検査結果

検体	アメーバ(pfu/ml)	レジオネラ属菌 (cfu/100ml)	血清型
自宅の浴槽水	検出せず	検出限界未満	
足湯浴槽水	検出せず	340 cfu/100ml	L.p SG1(180 cfu/100ml) L.spp (160 cfu/100ml)
足湯源泉	検出せず	検出限界未満	



レーン7:患者由来 *L.p* SG1 株

レーン8、9:足湯浴槽水由来 *L.p* SG1 株

M: Lambda ladder

その他のレーン:他の温泉由来 *L.p* SG1 株

制限酵素:*sfi* I

図1 *L.p*SG1 の PFGE パターン

表2 再調査結果

検体	一般細菌	ATP*(RLU**)	レジオネラ属菌	アメーバ	その他
足湯浴槽水	260 cfu/ml	17	560 cfu/100ml	4 pfu/100ml	大腸菌群(+) 大腸菌(-)
冷却用水道水	20 cfu/ml	7	<10 cfu/100ml	検出されず	大腸菌群(-) 大腸菌(-)
浴槽壁 (ふき取り)	54 cfu/cm ²	8,792	<4 cfu/cm ²	検出されず	
浴槽内銅像壁 (ふき取り)	184 cfu/cm ²	4,005	<4 cfu/cm ²	8 pfu/cm ²	
浴槽タイル目地 (ふき取り)	1,320 cfu/cm ²	165,371	2,640 cfu/cm ²	48 pfu/cm ²	
浴槽内岩 (ふき取り)	760 cfu/cm ²	203,516	2,480 cfu/cm ²	300 pfu/cm ²	
オーバーフロー用配 管(ふき取り)	2,240 cfu/cm ²	6,776	80 cfu/cm ²	2 pfu/cm ²	

* ATP 測定面積は 10cm²

** RLU:Reactive Light Unit(相対発光量)

平成 19 年度 厚生労働省新興再興感染研究事業
「広域における食品由来感染症を迅速に探知するために必要な情報に関する研究」
分担研究報告書

組換えノロウイルスおよびサポウイルスの作製とその応用

分担研究者 武田 直和 (国立感染症研究所ウイルス第二部)

要旨 ノロウイルス (NoV) の遺伝子型と抗原性の関係を明らかにするために組換えウイルス様粒子 (VLPs) とその抗血清との交差反応性を抗体 ELISA および抗原 ELISA で解析した。今回発現した遺伝子群 GI/7、GI/12、GI/14 および GII/13 の VLPs は相互に異なった抗原型を示した。同様に、SaV GI/1、GI/5、GII/2、GII/3、GIV、および GV の VLPs を発現し、高力価血清を作製した。これらの株は NoV 同様、相互に異なった抗原性を示した。これらの VLPs は遺伝子群特異的単クローン抗体のスクリーニングに有用である。

協力研究者 グラント・ハンスマン (国立感染症研究所ウイルス第二部)

A. 研究目的

ノロウイルス (Norovirus、NoV) 感染の検出法として、現在、遺伝子学的検出法と免疫学的検出法が用いられている。両者を比較した場合、遺伝子学的方法 (PCR 法) は、感度および特異性の点で優れており、リアルタイム PCR 法などを用いれば、かなり迅速性も増してきてはいる。しかし、操作が煩雑で手間と技術が必要とされている。一方、免疫学的方法は感度の点で遺伝子学的方法にはやや劣るものの、迅速、簡便で経済的にも優れ、多検体が同時に検出できる一次スクリーニングには適している。この免疫学的手法に、より広範囲に交差反応する単クローン抗体 (MAbs) を加えれば、さらに感度が高くなることが期待される。

ノロウイルスは遺伝学的に大きく 2 つのグループである genogroup 1 (GI) と genogroup 2 (GII) に分類される。これら遺伝子群はさらに少なくとも 16 (GI/1-GI/16) と 18 (GII/1-GII/18) の遺伝子型に分類され、計 30 種類以上の NoV がこれまで知られている。これまで、我々は GI で 6 種類、GII で 13 種類のウイルス様粒子 (NoV VLPs) を作製した。またこれら VLPs に対する高力価抗体を作製し、交差反応

性を調べることによって遺伝学的な差が抗原性と密接に関連していることを見出した。またいくつかの VLPs では MAbs を作製し、ウイルスの抗原学的解析に応用するとともに、MAbs の特性を生かした ELISA 法の開発を手がけ、本邦では、唯一の診断方法として厚生労働省から認可されている抗原検出 ELISA の開発に成功した。本研究ではいまだ成功していない遺伝子型の VLPs の発現を行なうとともにその抗原性を明らかにすることを目的とした。

一方、サポウイルス (Sapovirus、SaV) も頻度は低いものの、感染性胃腸炎の重要な原因ウイルスとして知られている。サポウイルスはノロウイルス同様、遺伝学的には極めて多様で、現在までに genogroup I から V まで 5 つのグループに分類されている。このうちヒトからは GI、GII、GIV、GV の遺伝子群が検出され、さらにこれら遺伝子群にはいくつかの遺伝学的に異なる遺伝子型が存在する。サポウイルスウイルスに関しては、遺伝子学的方法はあるものの、免疫学的な診断法が確立されているとはいいがたい。そこで、今回はサポウイルスの簡便・迅速・経済的・多検体検出可能な診断法を開発する目的で、SaV VLPs の作製を試みた。

B. 材料と方法

NoV あるいは SaV による集団発生事例から患者糞

便を採取し、10%乳剤を調製した。さらに定法どおり、RNA抽出、cDNA合成、PCRによる増幅と遺伝子解析、系統解析による遺伝子型の同定、構造蛋白領域の増幅とクローニング、組換えバキュロウイルスの作製と構造蛋白発現を経てVLPsを作製した。シヨ糖密度勾配遠心法、塩化セシウム平衡密度勾配遠心法でVLPsを精製して免疫源として用いた。交差反応は免疫源を固相化した抗体ELISA法、高力価血清を固相化した抗原ELISA、およびウエスタンブロット法で検討した。

C. 結果

1) 系統樹解析

発現に用いるNoVの遺伝子型を同定するためにVP1からpoly(A)までのゲノムRNA3'末端の約2.6kbをRT-PCRで増幅し、その塩基配列を決定した。本研究で構築した日本版カリシネット(<http://teine.cc.sapmed.ac.jp/~calici/>)を利用して得られた配列の分子系統解析を行い、発現する遺伝子型が、いまだVLPsが得られていないNoV GI/7、GI/12、GI/14、およびGII/13であることを確認した。SaVについても同様に塩基配列を解析し、遺伝子型がSaV GI/1、GI/5、GII/2、GII/3、GIV、およびGVであることを確認した。SaV GIVとGVに関しては現在までに検出された遺伝子型は一つである。

2) 抗体ELISAによる解析

精製したNoV GI/7、GI/12、GI/14およびGII/13のVLPsをこれまで発現したNoV GIおよびGIIのVLPsとともに固相化し、抗VLPs高力価血清との交差反応性を調べた。その結果、NoV GI/7、GI/12およびGI/14 VLPs間には低いながらも相互に交差反応が検出された。一方、今回発現した3種類のVLPsはGII VLPsで作製した抗血清とは全く反応せず、GIとGIIの遺伝学的差異が免疫学的な差異として検出された。NoV GIIのGII/14についても同様に、これまで発現したNoV GIIの抗血清とは交差反応を示すものの、上記3種類を含むNoV GIで作製した血清とは全く交差反応が検出されなかった。

3) 抗原ELISAによる解析

NoV GI/7、GI/12、GI/14およびGII/13 VLPsで作製した抗血清を含むこれまでに作製した高力価の抗VLPs血清をマイクロプレート上に固相化し、GIおよびGII VLPsとの交差反応性をELISAで検討した。抗体ELISAとは対照的に、GIとGIIの区別なく全ての組合せで検出しうるような交差反応性は示されず、遺伝子型で区別されている個々の株は抗原的にも異なる株であることが示された。

4) SaVの抗原性

SaVについてもGI/1、GI/5、GII/2、GII/3、GIV、およびGVのVLPsと高力価血清を用いて交差反応性を抗体ELISAと抗原ELISAで試験した。抗体ELISAはNovの場合と同様にGI/7とGI/12間、GII/2とGII/3間では交差反応がみられるものの、他の遺伝子群であるGIVやGVの間では検出されなかった。抗原ELISAもNoV同様、全ての組み合わせで交差反応性は検出されず、6種類のSaVは免疫学的に異なる株であることが示された。

D. 考察

今回発現に成功した3種類のNoV GI株を含めこれでNoV GIでは9遺伝子型の9株で、GIIでは今回の1株を含め14遺伝子型の24株でNoV VLPsを作製することができた。抗体ELISAの結果は各遺伝子群にはそれぞれ共通のエピトープが存在することを示唆しており、より反応性の高い遺伝子群特異的単クローン抗体作製への応用が期待される。一方、SaVはいまだ新規の遺伝子型が検出されており、すべての遺伝子型が出揃うまでは時間がかかりそうである。しかし、今回の解析からSaVにおいてもNoV同様、遺伝子群に共通に反応する単クローン抗体作製での可能性は十分であり、今後抗原検出ELISAの充実を図るとともに、イムノクロマトでの応用を視野に入れて実験を進めていきたい。NoV同様、SaVにおいてもデータベースの整備が必要である。これらのVLPsは遺伝子群特異的単クローン抗体のスクリーニングに有用であり、残りの株についてもVLPsの作製に向けて研究を進展させたい。

D. 結論

1. NoV GI/7、GI/12、GI/14 および GII/13 の VLPs を発現し、高力価血清を作製した。抗体 ELISA および抗原 ELISA で交差反応性を調べた結果、相互に異なった抗原型を示した。
2. SaV GI/1、GI/5、GII/2、GII/3、GIV、および GV の VLPs を発現し、高力価血清を作製した。NoV 同様、これらは相互に異なった抗原性を示した。

E. 研究業績

1) 論文発表

- Shirato-Horikoshi H, Ogawa S, Wakita T, Takeda N, Hansman GS, 2007. Binding activity of norovirus and sapovirus to histo-blood group antigens. *Arch Virol* 152: 457-61.
- Ozawa K, Oka T, Takeda N, Hansman GS, 2007. Norovirus infections in symptomatic and asymptomatic food handlers in Japan. *J Clin Microbiol* 45: 3996-4005.
- Oka T, Yamamoto M, Yokoyama M, Ogawa S, Hansman GS, Katayama K, Miyashita K, Takagi H, Tohya Y, Sato H, Takeda N, 2007. Highly conserved configuration of catalytic amino acid residues among calicivirus-encoded proteases. *J Virol* 81: 6798-806.
- Hansman GS, Sano D, Ueki Y, Imai T, Oka T, Katayama K, Takeda N, Omura T, 2007. Sapovirus in water, Japan. *Emerg Infect Dis* 13: 133-5.
- Hansman GS, Saito H, Shibata C, Ishizuka S, Oseto M, Oka T, Takeda N, 2007. An outbreak of gastroenteritis due to Sapovirus. *J Clin Microbiol* 45:1247-1349
- Hansman GS, Oka T, Sakon N, Takeda N, 2007. Antigenic diversity of human sapoviruses. *Emerg Infect Dis* 13: 1519-1525.
- Hansman GS, Oka T, Okamoto R, Nishida T, Toda S, Noda M, Sano D, Ueki Y, Imai T, Omura T, Nishio O, Kimura H, Takeda N, 2007. Human sapovirus in clams, Japan. *Emerg Infect Dis* 13: 620-2.
- Hansman GS, Ishida S, Yoshizumi S, Miyoshi M, Ikeda T, Oka T, Takeda N, 2007. Recombinant sapovirus gastroenteritis, Japan. *Emerg Infect Dis*: 786-788.
- ##### 2) 著書 (総説)
- Hansman GS, Oka T, Katayama K, Takeda N, 2007. Human sapoviruses: genetic diversity, recombination, and classification. *Rev Med Virol* 17: 133-41.
- ##### 3) 学会発表
- Shirato H, Takeda N, 2007.10. Interaction between norovirus and histo-blood group antigens. *The 2nd Thailand-Japan Joint Forum on Infectious Diseases. Bangkok, Thailand.*
- Oka T, Okamoto R, Arita T, Toda S, Noda M, Sano D, Ueki U, Imai T, Omura T, Nishio O, Kimura H, Takeda N, Hansman GS, 2007. 9. Detection of Human Sapovirus from clams in brackish water. *14th International Symposium on Health-Related Water Microbiology. Tokyo.*
- Hansman GS, Sano D, Ueki U, Imai T, Oka T, Katayama K, Takeda N, Omura T, 2007.9. Sapovirus in Water, Japan. *14th International Symposium on Health-Related Water Microbiology. Tokyo.*
- Someya Y, Takeda N, Wakita T, 2007.5. Glutamate 54 of Norovirus 3C-like Protease. *The 8th International Symposia on Positive-Strand RNA Viruses. Washington DC.*
- Oka T, Hansman G, Ishida S, Saito H, Yoshizumi S, Miyoshi M, Ikeda T, Shibata C, Ishizuka S, Takeda N, 2007.5. Viral Loads of Sapovirus. *The 8th International Symposia on Positive-Strand RNA Viruses. Washington DC.*
- Hansman G, Oka T, Takeda N, 2007.5. Antigenic Diversity of Human Sapoviruses. *The 8th International Symposia on Positive-Strand RNA Viruses. Washington DC.*

- 本村和嗣, 岡智一郎, Hansman GS, 横山勝, 神田忠仁, 武田直和, 佐藤裕徳, 2007.10. 2006-2007年の間に流行したノロウイルスのウイルスゲノム解析. 第55回日本ウイルス学会学術集会. 札幌.
- 北元憲利, 三好龍也, 内野清子, Hansman GS, 武田直和, 田中智之, 2007.10. サポウイルスに対する単クローン抗体の樹立とその交叉性. 第55回日本ウイルス学会学術集会. 札幌.
- 染谷雄一, 武田直和, 脇田隆字, 2007.10. ノロウイルス3C様プロテアーゼを構成するアミノ酸ザンキの役割. 第55回日本ウイルス学会学術集会. 札幌.
- 石田勢津子, 吉澄志磨, 三好正浩, 奥井登代, 岡野素彦, Hansman GS, 岡智一郎, 武田直和, 2007.10. サポウイルスによる胃腸炎集団発生事例-北海道-. 第55回日本ウイルス学会学術集会. 札幌.
- 小澤一弘, 岡智一郎, Hansman GS, 片山和彦, 武田直和, 2007.10. 調理従事者から検出されたノロウイルスの遺伝子解析. 第55回日本ウイルス学会学術集会. 札幌.
- 山本真民, 岡智一郎, Hansman GS, 宮下佳奈, 片山和彦, 小川智子, 脇田隆字, 武田直和, 2007.10. サポウイルス粒子形成機構の解析. 第55回日本ウイルス学会学術集会. 札幌.
- 斎藤博之, Hansman GS, 岡智一郎, 武田直和, 2007.10. 保育園で流行したサポウイルスの解析. 第55回日本ウイルス学会学術集会. 札幌.
- 原田誠也, 岡田峰幸, 岡智一郎, Hansman GS, 武田直和, 2007.10. サポウイルスによる乳幼児散发性胃腸炎の分子疫学解析-熊本県-. 第55回日本ウイルス学会学術集会. 札幌.
- 宮下佳奈, 岡智一郎, Hansman GS, 山本真民, 片山和彦, 小川智子, 脇田隆字, 武田直和, 2007.10. 哺乳動物細胞を用いたサポウイルス組換え粒子の発現. 第55回日本ウイルス学会学術集会. 札幌.
- 岡智一郎, 横山勝, 宮下佳奈, 山本真民, Hansman GS, 片山和彦, 小川智子, 脇田隆字, 佐藤裕徳, 武田直和, 2007.10. カリシウイルスプロテアーゼの基質認識機構の共通性. 第55回日本ウイルス学会学術集会. 札幌.
- 横山勝, 岡智一郎, 山本真民, 宮下佳奈, Hansman GS, 片山和彦, 小川智子, 神田忠仁, 武田直和, 佐藤裕徳, 2007.10. サポウイルスプロテアーゼ・基質複合体の構造解析. 第55回日本ウイルス学会学術集会. 札幌.
- Hansman GS, Oka T, Takeda N, 2007.10. Antigenic Diversity of Human Sapoviruses. 第55回日本ウイルス学会学術集会. 札幌.
- 武田直和, 2007.9. 食品媒介ウイルス感染症. 第28回日本食品微生物学会学術総会 教育講演. 東京.
- 武田直和, 2007.6. ノロウイルスの大流行: 特徴と原因. 第48回 日本臨床ウイルス学会 シンポジウム. 富山.

F. 健康危機情報

なし

E. 知的財産の出願、登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし