

## 症状を用いた健康危害物質別の事例検索システム

### Search System for Food Poisoning Emergency Incidents Classified by Causative Toxic Substances Using Symptom

阿部 和男 白取 博志 武部 芳明

Kazuo ABE, Hiroshi SHIRATORI, Yoshiaki TAKEBE

健康危機が発生した場合には、地方衛生研究所の機能を十分に発揮して未知の病因物質の分析・特定を迅速かつ正確に実施して、危害の拡大を可能な限り防がなければならない。そこで化学物質等による健康危害が発生した場合を想定して、優先的に検査すべき病因物質の事例を検索するためのシステムを作成した。本システムは、経口摂取による健康危害が知られている重金属5物質、農薬8物質、その他の化学物質8物質、自然毒50物質による健康危害事例127例、専門書等に示されている病因物質51例、合計178例の症状及び潜伏時間等をデータベース化するとともに、これらから病因物質として疑われる物質による事例を検索するものである。本システムは保健環境センターのホームページ及び地方衛生研究所ネットワーク上で、ID番号及びパスワードによりクローズで利用でき、これらの情報をデータとして再利用しやすいXML (Extensible Markup Language) でも出力できる形式とした。

キーワード：健康危害；症状；潜伏時間；化学物質；自然毒

**Keywords** : food poisoning emergency ; symptom ; incubation period ; chemical substance; natural poisoning

## 1 緒 言

毒物カレー事件に代表される健康危機の発生に対して、専門的知見や高度検査機能を有する機関としての地方衛生研究所に求められる役割は、近年ますます増大している。健康危機が発生した場合には、地方衛生研究所の機能を十分に発揮して未知の病因物質の分析・特定を迅速かつ正確に実施して、危害の拡大を可能な限り防がなければならない。そこで我々は、健康危害が発生した場合に優先的に検査対象とすべき物質を絞り込む目的で、経口摂取による健康危害が知られている化学物質及び自然毒等による健康危害の実例と専門書に示されている病因物質の症状及び潜伏時間等の情報を収集してExcelによるデータベースを作成し2003年の本報に報告した。今回、我々は、昨年収集した事例の中から、疑われる病因物質による実例及び参考文献等に示されている一般的な症状等を容易に検索するためのシステムの開発を試みた。なお、本研究は、厚生労働科学研究の分担研究「健康危機管理事例のデータベース化とその利用に関する研究」で宮城県の担当分をまとめたものである。

## 2 方 法

### 2.1 データベースの作成

重金属5物質、農薬8物質、その他の化学物質8物質、

毒きのこ18種類、その他の植物性自然毒21種類、動物性自然毒11種類による健康危害の実例127件と一般の専門書等に示されている病因物質51例（以下「一般例」と呼ぶ）、合計178例について、物質名ごとに次の事項を調査してデータベースを作成した。

物質名、分類名、摂取形態（実例のみ）、発生年（実例のみ）、患者数（実例のみ）、摂取要因（実例のみ）、摂取形態（実例のみ）、毒性分、発症摂取量（一般例のみ）、致死量（一般例のみ）、症状、潜伏時間、摂取時の特記事項、発症時の特記事項（実例のみ）、摂取量と症状の特徴（一般例のみ）。

### 2.2 症状による検索

患者の症状を用いて、疑わしい病因物質による健康危害事例を抽出する。

### 2.3 物質名による検索

物質名を用いて、疑わしい病因物質による健康危害事例を抽出する。

### 2.4 システムの構築

保健環境センターのLinuxサーバーを用い、wwwサーバーにApacheを用いてホームページ及び地方衛生研究所ネットワーク上で、ID番号及びパスワードによりクローズで利用できる環境とする。システムの開発にはすべて使用料無料のオープン・ソースを使用した。すなわ

ちプログラム作成にphpとJavaScript言語を用い、データベースの構築にはPostgreSQLを用いた。データのメンテナンスは、サーバーにあるPostgreSQL上のデータとWindows末端上のMS-Access（データベース）をODBC経由で接続して管理する方式を用いる。本システムは、インターネットを介して提供された情報をデータとして再利用しやすいXML（Extensible Markup Language）でも出力できる形式とする。

### 3 結 果

患者の症状または物質名のいずれかを用いて、疑われ

る物質による危害事例を検索するシステムを構築した。その手順を次に示す。

#### 3.1 症状による検索方法

##### 3.1.1 「症状で選択」を選ぶ（図1）。

3.1.2 患者に共通している症状や特異的な症状を3～4つ選択して検索する（図2）。

3.1.3 検索された物質の中で、健康危害事件の現場状況等から可能性があると考えられる物質を選択して、当該物質の実例または一般例を検索する。検索された物質の画面を図3に、調査しようとしている物質の一般例・実例の選択画面を図4に示す。



図1 検索方法の選択画面



図2 症状による検索画面



図3 検索された物質一覧



図4 調査物質の事例選択画面

3.1.4 検索された事例の備考には、病因物質が摂取された状況や、患者の症状が詳しく表示される。潜伏時間の欄には、初発患者と最終発症者の潜伏時間、患者が多発した潜伏時間がそれぞれ表示される。症状の表示欄には、発現順番、症状の発現率、症状の強度などが判明している場合にはそれらも表示される。また、患者1人当たりの摂取量や残品の検査結果も記録されていればそれらも表示される(図5)。一般例については、専門書に示されている症状、潜伏時間、発症毒量・致死量等も

表示される。

### 3.2 物質・分類名による検索

本システムに入力されている病因物質の中から物質または分類名を選択して、当該物質の実例及び一般例が表示される。

物質・分類名による検索画面を図6に示す。

### 3.3 XMLによるデータの表示

「検索された事例」画面中の「xml作成」を選択すると、当該事例のデータが表示される(図7)。

#### 4 考 察

化学物質や自然毒による健康危害では、当該化学物質や自然毒の摂取量によって患者の症状や潜伏時間の長さにバラツキがみられることがあることから、できるだけ同一物質による実例を数多く収集するように努めた。実例に一般例を加えたこのシステムは、病因物質を迅速かつ容易に検索するための補助的なツールとなるものと考えられる。今回は、化学物質等の経口による急性の健康危害を収集したが、今後は、検索の範囲拡充や精度を高めるために、多くの自治体の情報提供や専門家の協力を得て

事例数を増やすとともに、呼吸器からの摂取や経皮からの吸収、及び微生物による事例なども含めて、本データベースの充実を図りたい。

また、本システムでは、サイト側のいろいろなアプリケーションが直接読み込んで利用できる共通の情報形式のXML形式で情報が提供される方式を採用したが、この方法は地研の所有するいろいろな情報交換の効果的な手段としても有効なものと考えられる。従来は、インターネットのWebサイトには、莫大な情報がHTML形式で蓄積されているが、限られた領域内だけで利用される形式



図5 検索された実例



図6 物質・分類名による検索画面

```

<?xml version="1.0" encoding="UTF-8" ?>
- <全体>
- <原因物質>
  <事例分類>事例1</事例分類>
  <摂取形態>程口</摂取形態>
  <物質名>次亜塩素酸Na</物質名>
  <大分類>家庭用品</大分類>
  <中分類>洗剤類</中分類>
  <発生年>H4</発生年>
  <患者数>2人</患者数>
  <原因>飲食店の従業員が水と間違えて客に提供</原因>
  <毒成分>次亜塩素酸Na</毒成分>
  <摂取量 />
  <早い人 />
  <多発時間>直後</多発時間>
  <遅い人 />
  <備考>飲食店で水差しの消毒のために入れていた家庭用漂白剤(1,500ppm)を含んだ水を、従業員が誤ってコップに入れて客2名に提供した。客の1名は一口、もう1名は一気にコップに半分ほど飲んだところ、口の中に刺激を感じ嘔吐した。また、咽喉から胃にかけて強い痛みを感じた(行政)。</備考>
  <順位>0</順位>
  <症状>嘔気</症状>
  <参考事例 />
  <順位>0</順位>
  <症状>嘔吐</症状>

```

図7 XML形式によるデータ

なので、情報の共有や交換は限定的なものであった。しかし、例えば、食中毒や感染症等の健康危害事例の調査報告書等の情報をXML形式で提供されれば、地研のWebサーバー間で、それぞれのデータベースのプログラムに関係なく、これらの情報をデータとして再利用できるので、情報の活用範囲の飛躍的な拡大が期待される。

## 5 まとめ

健康危害が発生した際に、優先的に検査対象とすべき化学物質及び自然毒の絞り込みの方法として、患者の症状から疑われる病因物質別の健康危害事例検索システムを開発した。システムを構築するに当たっては、本システムを利用する地研が、インターネットを介して提供された情報をデータとして再利用しやすいXMLで出力する形式とした。

## 謝 辞

ご協力をいただいた大阪府公衆衛生研究所の織田所長を始め、厚生労働科学研究の当分担任研究班の各位及び転載に許諾していただいた著者及び出版社に対して深く感謝致します。

## 参 考 書 籍

- 1) 内藤裕史, 中毒百科, (株)南江堂 (2001)
- 2) (財)日本中毒情報センター, 症例で学ぶ中毒事故とその対策, (株)じほう (2000)

- 3) 荒記俊一, 中毒学, (株)朝倉書店 (2002)
- 4) Kent R.Olson, 坂本哲也監訳, 中毒ハンドブック, (株)メディカル・サイエンス・インターナショナル(2001)
- 5) 関洲二, 急性中毒診療マニュアル, 金原出版(株)(2001)
- 6) 鶴飼卓監修, (財)日本中毒情報センター, 急性中毒処置の手引き, (株)じほう (2003)
- 7) Anthony T.Tu., 井上尚英監修, 中毒学概論, (株)薬業時報社, (1999)
- 8) 西玲子・福永栄子・渡辺せい子・守田美和, 薬・毒物中毒救急マニュアル, (株)医業ジャーナル社 (1999)

## URL

- ・ PHPユーザー会  
<http://www.php.gr.jp/>
- ・ JAPAN APACHE USERS GROUP  
<http://www.apache.jp/>
- ・ 日本PostgreSQLユーザ会  
<http://www.postgresql.jp/>
- ・ PostgreSQL ODBC Driver 日本語版  
[http://www.interwiz.koganei.tokyou.jp/software/Psql\\_ODBC](http://www.interwiz.koganei.tokyou.jp/software/Psql_ODBC)

## 平成15年度に発生した2類・3類感染症事例

### Cases of Categories II and III Infectious Diseases in Miyagi Prefecture

田村 広子 山口 友美\*<sup>1</sup> 佐々木 美江  
畠山 敬 御代田 恭子\*<sup>2</sup> 秋山 和夫

Hiroko TAMURA, Yumi YAMAGUCHI, Mie SASAKI  
Takashi HATAKEYAMA, Yasuko MIYOTA, Kazuo AKIYAMA

平成15年度に宮城県（仙台市を除く）で調査した細菌性の2類感染症は赤痢および腸チフスを疑う2事例で、そのうち1事例からチフス菌を分離・同定した。この事例では、チフス菌の免疫学的性状が通常と異なっており、菌の同定のために必須なO抗原、H抗原およびVi抗原を決定することができず、抗原関連遺伝子の検索を必要とする稀なケースであった。さらに、3類感染症は16事例の届出があり、2事例は飼育牛が関連していた。このうち1事例は食中毒事件の調査中にO157の感染が判明するという特異なケースであった。

キーワード：腸管出血性大腸菌；飼育牛；チフス菌

**Keywords** : Enterohemorrhagic *E.Coli* ; Cattle ; S.Typhi

## 1 はじめに

平成11年4月1日より施行された「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（感染症法）」の分類が平成15年11月5日に大幅に改正され、4類感染症の見直しと新たに5類感染症が新設されたが、2類・3類感染症の対象疾患に変更は無かった。2類・3類感染症は依然として重篤な健康被害を及ぼし、防疫対策も困難であるため、細菌学および疫学的調査は特に重要である。当センターでは毎年県内で発生する2類感染症の数事例と3類感染症の約50事例について検査を実施しており、防疫対策のための迅速な対応が常に求められている。

平成15年度はこれらの事例の中から、通常の方法では同定困難であった腸チフスの事例と、飼育牛が関連した腸管出血性大腸菌（EHEC）感染症の2事例を経験したので報告する。

## 2 材料および方法

### 2.1 対象

感染症法に基づき、平成15年度に「1・2・3類感染症発生届出票」が提出された患者の菌株、患者家族や接触者の便、および食材、患者生活環境のふき取り検体を検査材料とした。

### 2.2 方法

民間の検査センター等で分離した2類・3類感染症に該当する全ての菌株は、管轄保健所を經由して当センターに搬入され、生化学性状の確認と血清型別を行い原因菌を再確認した。菌株がEHECの場合はPCRによる毒素遺伝子保有の確認と、逆受身ラテックス凝集反応（RPLA）による毒素の検出を行った。

便のEHECおよびチフス菌分離は常法で行い、菌株の遺伝子解析はパルスフィールドゲル電気泳動法（PFGE）を用いて行った。

食材およびふき取り検体については、等量のリン酸緩衝食塩液でストマッキングした食材、およびふき取り綿棒を緩衝液で良く混和して増菌培地に植え、その後の検査は常法に従って行った。

チフス菌の遺伝子検出に用いたプライマーはHiroseら<sup>1)</sup>が報告した*tyv* (*rfbE*), *pri* (*rfbS*), *fliC-d*およびHashimotoら<sup>2)</sup>が設計した*viaB*を用いた。なお、*tyv*はチベロースの変換遺伝子を標的とし、サルモネラO9群に特異的で、*pri*はパラトース合成遺伝子を検出し、O2群・O9群で陽性となる。また、*fliC-d*はd型の鞭毛抗原遺伝子を、*viaB*はVi抗原遺伝子を検出する。なお、テンプレートはTSI培地上の純培養菌を蒸留水100μlに懸濁後、95℃ 6分加熱し作製した。PCRはHiroseら<sup>1)</sup>の方法に従った。

ベロ毒素遺伝子の検出はPollard<sup>3)</sup>のプライマー、*vh2*バリエーションの検出にはYamazaki<sup>4)</sup>のプライマーを用い、

\* 1 現 宮城県拓桃医療療育センター

\* 2 現 宮城県動物愛護センター

PCRは94℃ 1分-55℃ 1分-74℃ 1分を35サイクルの条件で実施し、2.5%アガロースゲルで電気泳動後にDNAバンドを確認した。また、菌株をCAYE培地で37℃、一晚、回転培養を行いRPLAでベロ毒素の検出を行った。仙台家畜保健衛生所から提供を受けた牛由来9株も同様の方法で検査を実施した。

PFGEは*Xba I* (40U/サンプル) を使用して酵素処理を行った後にCHEF MAPPER (BIO-RAD社) を用いて22時間電気泳動を行った。

### 3 結 果

#### 3.1 2類感染症

2類感染症は、赤痢の関連調査として1事例依頼されたが赤痢菌は検出されなかった。

また腸チフスとして1事例が依頼された。患者は96歳の男性で、海外へは数十年前に渡航したのみであった。平成15年8月20日、県内の医療機関に入院中に腸チフスが疑われ、医療機関において細菌検査を実施した結果、チフス菌と同定され、8月27日当センターに血液培養ボトル、および医療機関でSSK寒天培地に分離した純培養菌が搬入された。

血液培養ボトルから性状の異なる2種類(O9+株、Vi+株と略す)の菌株を分離した。その性状を表1に示した。また、SSK寒天培地に塗抹された純培養菌はVi+株と同様の性状を示した。

O9+株はO9群に凝集するがVi抗原を保有せず、またH抗原は全ての抗血清に凝集したため血清型は決定できなかった。一方、Vi+株はO4群およびO7群と凝集し、チフス菌の血清型であるO9群には反応しなかった。また、LIM培地で運動性を示さず、H抗原は判定できなかった。

表1 腸チフス事例から分離された菌株の性状

集 落 型		Vi+株	O9+株
		Smooth	Rough
TSI	斜面/高層	-/A	-/A
	H <sub>2</sub> S	(-)	(+)
	ガ ス	(-)	(-)
LIM	Lys	(+)	(+)
	Ind	(-)	(-)
	Mo	(-)	(+ <sup>W</sup> )
Voges-Proskauerテスト		(-)	(-)
O抗原(生 菌)	Vi (+)	Vi (+)	Vi (-)
	O 多価(-)	O 1 多価(-)	O 9 (+)
	O 1 多価(-)		
O抗原(加熱1回目)	Vi (+)		
	O 多価(-)		
	O 1 多価(-)		
O抗原(加熱2回目)	Vi (+)		
	O 4 (+)		
	O 7 (+)		

以上より、2種類の菌株は生化学的にチフス菌の性状を示すが、血清型ではチフス菌と同定できなかった。そこでPCRを用いて保有する遺伝子からのチフス菌の決定を試み、そのPCRの泳動像を図1に示した。菌株は、血液培養由来のO9+株が2株、Vi+株が3株、医療機関分離培地由来が2株、計7株、加えて対照株として国立感染症研究所から分与されたS.Typhi 1株、参考としてS.EnteritidisとS.Oranienbrugを使用した。

その結果、*tyv*, *filC-d*および*prt*遺伝子が7株ともに対照株と同様なパターンを示し、O9群H抗原d型のS.Typhiであることを確認した。またVi抗血清では判定できなかったVi+株からはVi遺伝子も検出されたが、O9+株については検出されず、Vi抗原が脱落した変異株と考えられた。

#### 3.2 3類感染症

平成15年度最初のEHEC感染症事例は5月23日に依頼され、最終事例は11月4日で計16事例、337検体について検査を行った。その結果ヒト由来としてO157を11株、O26を12株、O121を3株、計26株を分離した。その検出状況を表2・表3に示した。

分離株から検出したベロ毒素はO157の全てがVT1・2を産生しており、*vh2*バリエントも確認された。そこで本事例についてその概略を述べる。

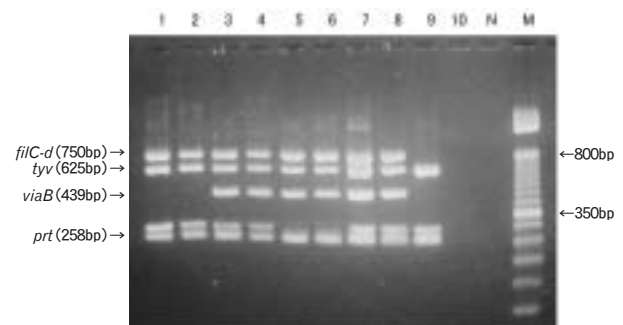


図1 PCR泳動像

- レーン1, 2 血液培養由来のO9+株
- レーン3~5 血液培養由来のVi+株
- レーン6, 7 医療機関分離由来株
- レーン8 S.Typhi
- レーン9 S.Enteritidis
- レーン10 S.Oranienbrug
- N 陰性対照
- M 50bpラダー

表2 検査検体数および遺伝子解析実施数

	事例数	検査検体数	PCR実施数	PFGE解析実施数
2類感染症 <sup>*1</sup>	2	14	7	0
3類感染症 <sup>*2</sup>	16	337	54	39

\*1: 赤痢, 腸チフス \*2: 腸管出血性大腸菌

表3 EHEC検出状況

No.	受付日	保健所	年 齢	性 別	血液型	ベロ毒素	備 考
1	5.23	仙 南	26	女	O121:H19	VT 2	
2	5.23	仙 南	4	男	O121:H19	VT 2	
3	5.23	仙 南	2	女	O121:H19	VT 2	
4	6.30	登 米	1	女	O26:H11	VT 1	
5	6.30	塩 釜	3	男	O26:H11	VT 1	
6	6.30	登 米	不明	女	O26:H11	VT 1	
7	7. 1	塩 釜	33	女	O26:H11	VT 1	
8	7. 1	塩 釜	62	男	O26:H11	VT 1	
9	7. 1	塩 釜	61	女	O26:H11	VT 1	
10	7. 7	大 崎	77	男	O157:H 7	VT 1 VT 2	
11	7. 8	大 崎	51	男	O157:H 7	VT 1 VT 2	
12	8.12	石 巻	3	女	O26:H11	VT 1	
13	8.15	登 米	4	男	O157:HNM	VT 1 VT 2	vh2 バリエント
14	8.15	大 崎	55	女	O26:HNM	VT 1	
15	8.18	仙 南	1	女	O26:H11	VT 1	
16	8.19	仙 南	54	女	O26:H11	VT 1	
17	9. 4	登 米	13	男	O157:H 7	VT 1 VT 2	
18	9. 4	登 米	66	女	O157:H 7	VT 1 VT 2	
19	9. 8	登 米	4	男	O157:H 7	VT 1 VT 2	
20	9. 8	仙 南	1	女	O26:H11	VT 1	
21	9.19	大 崎	1	女	O26:H11	VT 1	
22	10. 7	栗 原	52	女	O157:H 7	VT 1 VT 2	vh2 バリエント
23	10. 7	栗 原	1	不明	O157:H 7	VT 1 VT 2	vh2 バリエント
24	10.10	大 崎	1	不明	O157:H 7	VT 1 VT 2	vh2 バリエント
25	10.18	大 崎	68	男	O157:H 7	VT 1 VT 2	
26	11. 4	仙 南	62	女	O157:H 7	VT 1 VT 2	

\*塩釜総合支所に黒川支所依頼分も含む

平成15年10月に発生したウエルシュ菌による食中毒事例の調査過程で、患者グループの52歳の女性からベロ毒素産生性のO157が分離された。当時、被験者は下痢、腹痛の症状を呈していたため、家族内調査を実施したところ1歳の孫からも同様のO157を分離した。孫は保育園に通っており、下痢症状を呈している他の園児もいたことから保育所の調査も行い、職員、園児合わせて32件、食品92件、ふき取り30件、砂場の砂1件、浄化槽二次処理水1件を検査した。また、被験者宅は牛を飼育しており、仙台家畜保健衛生所で飼育牛糞からO157の分離を行った。

本事例から分離した株は52歳女性、女性の孫、保育園児のヒト由来株3株と、牛糞便からの牛由来株9株であり、VT1とvh2バリエントを産生していた(表4)。ま

表4 ベロ毒素検査結果

		検出毒素	ヒト由来	牛由来
RPLA		VT 1	+	+
		VT 2	W+	W+
PCR	Pollard	VT 1	+	NT
		VT 2	+	NT
	Yamazaki	vh2バリエント	+	+

W+ : Weak+ NT : not test

た、これらの菌株についてPFGEを実施したところ図2に示すように12株は全て同一パターンを示した。



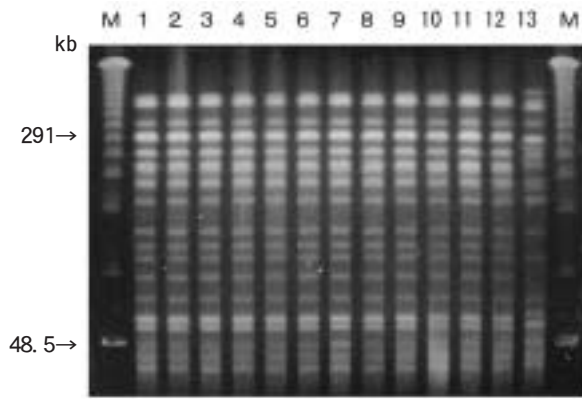


図2 PFGE泳動像

レーン1～9	牛由来株
レーン10	女性由来株
レーン11	孫由来株
レーン12	保育所の患者由来株
レーン13	他のO157散発事例由来株
M	λマーカー

さらに、飼育牛と家族4人から検出されたO26:H11 VT1のPFGEパターンが一致した事例も確認された。

#### 4 考 察

抗血清では同定困難な腸チフスの症例を経験した。チフス菌は消化管の中でも特に胆のう内で潜伏感染を起こすことが知られており、今回の事例は高齢で以前に渡航経験があったことから胆のうに保菌状態だったチフス菌が加齢とともに肝臓・腸管に波及し発症したものと考えられた。また、チフス菌は長期の保菌状態のうちに宿主免疫から逃れるため抗原的に変異を起こしやすく（VW変異<sup>5)</sup>）、この症例も定型的な性状を示さなくなったと思われ、このような菌株には遺伝子の検索が非常に有用であることが示唆された。

平成15年度のEHEC感染症事例数は例年と比べ約半数の16事例であったが、その中には飼育牛が感染源と推定された2事例を確認した。

一つは3歳児の発症を契機として家族3人と牛糞便からも同じO26が検出された事例、さらに食中毒関連調査を契機としてO157が検出されたケースで、食中毒事件が起こらなければ発見されなかった可能性のある事例である。食中毒事件以前の症状の有無は不明だが、孫からも

O157が分離されたことは症状の有無に関わらず、常に手洗いを励行するなど感染防止の基本を生活習慣とすることの重要性を示している。両事例とも複数の牛から同一の菌が分離されており、牛舎内での蔓延が確認された。EHECはごく少量の菌数で感染が起こりうることから、家畜に蔓延した場合、容易にヒトに感染の機会を与える。これは、山口ら<sup>6)</sup>が報告しているように食品由来以外のヒトEHEC感染症の感染源が家畜であることを強く推察させるものであり、畜産の盛んな地域や牛飼育世帯でのEHEC感染症罹患率が高いことと合致する。よって、畜産農家などでは牛からヒトへの感染経路を遮断することが防疫上特に重要と考えられる。

#### 5 ま と め

- (1) 免疫反応で血清型が決定できないチフス菌の同定にPCRが有用であった。
- (2) 牛が関連したEHEC感染症2事例では牛舎内に菌が蔓延しており、これにより罹患した可能性が高いことが示唆された。

#### 6 謝 辞

本事例におきまして牛由来の菌株を分与していただきました仙台家畜保健衛生所に深く感謝いたします。

#### 参 考 文 献

- 1) K. Hirose, K.Itoh, H. Nakajima, T.Kurazono, M. Yamaguchi, K. Mori, T.Ezaki, Y.Kawamura, K.Tamura, H.Watanabe: *J.Clin.Microbiol.*, **40**, 633(2002).
- 2) K.Hashimoto, Y.Itoh, Y.Fujinaga, A.Q.Khan, F.Sultana, M.Miyake, K.Hirose, H.Yamamoto, T.Ezaki: *J.Clin.Microbiol.*, **33**, 775 (1995).
- 3) D.R.Pollard, W.M.Johnson, H.Lior, S.D.Tyler, K.R.Rozee: *J.Clin.Microbiol.*, **28**, 540 (1990).
- 4) S.Yamazaki, Z.Lin, H.Shirai, A.Terai, Y.Oku, H.Ito, M.Ohmura, T.Kawamura, T.Tsukamoto, H.Kurazono, Y.Takeda: *Microbiol.Immunol.*, **40**, 345 (1996).
- 5) 坂崎利一, 田村和満: “腸内細菌”, 上巻, p.152 (1992) (近代出版).
- 6) 山口 友美: 平成15年度 保健福祉部業務研究等報告会資料, 2003, 11.

# 宮城県における腸管出血性大腸菌(EHEC)感染症の発生とその傾向

## Epidemiological Study of Enterohemorrhagic-*E.coli* Infection in Miyagi Prefecture.

山口 友美\*<sup>1</sup> 田村 広子 佐々木 美江  
畠山 敬 御代田 恭子\*<sup>2</sup> 秋山 和夫

Yumi YAMAGUCHI, Hiroko TAMURA, Mie SASAKI  
Takashi HATAKEYAMA, Yasuko MIYOTA, Kazuo AKIYAMA

宮城県でのEHEC感染者数は毎年50名前後で推移しており、食品を介する事例をはじめとして、家族内感染事例が多数発生している。全国での発生は血清型O157を感染原因とする報告が多くなされているが、宮城県ではO26がその主体となっている。その理由を解明するため、過去5年間の各保健所管内での発生状況をまとめ比較を行った。その結果、酪農が盛んな地域ではO26による感染症の発生割合が高く、いわゆる都市部での発症原因はO157が多数を占めることが判明した。

キーワード：腸管出血性大腸菌；牛由来

**Keywords** : Enterohemorrhagic-*E.coli* ; derived from cattle

### 1 はじめに

腸管出血性大腸菌 (EHEC) 感染症は、感染症法において唯一3類感染症に分類されている。患者は主に下痢症状を呈し、多くの症例では回復するが溶血性尿毒症候群 (HUS) などの重篤な合併症を併発した場合には致死率の高い感染症である。EHECの最も重要な病原因子であるペロ毒素 (VT) にはVT1とVT2があり、VT2にはさらにバリエーションと呼ばれる亜型が存在し、VT2c～VT2gに大別される。これらの型の違いは、パルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) と同様に疫学調査において重要な資料となる。<sup>1～3)</sup>

宮城県におけるEHEC感染者数は毎年50名前後で推移しており、食品を介する事例をはじめとして、家族内感染事例が多数発生している。そこで過去5年間のEHECの検出状況から、宮城県で発生するEHEC感染症の特徴について若干の知見を得たので報告する。

### 2 方 法

#### 2.1 検査対象

検査材料は、EHEC感染症患者由来の菌株と患者家族や接触者の便、食品及び家畜や環境のふき取りから分離したEHECを材料とした。対象は、ヒト由来として平成11年度から15年度に届出があった事例およびそれらから検出された239株、牛由来としては平成12年度から14年度

\* 1 現 拓桃医療療育センター

\* 2 現 動物愛護センター

に感染症の関連調査で分離された17株を用いた。

#### 2.2 検査方法

EHECの検査方法は定法に従い、ペロ毒素の確認は、ラテックス凝集反応 (RPLA) によるVT産生試験とPCR法によるVT遺伝子の検出を行った。VT2バリエーションの検出については、Pollard, Tyler<sup>4)</sup>らのプライマーを用いてPCR法により遺伝子の検出を行った後に、2種類の制限酵素 (*Pvu* II, *Hae* III) を用いたPCR-RFLP法によりその分類を行った。

### 3 結 果

#### 3.1 平成11年度から15年度のEHEC検出状況

全国におけるEHEC感染症の発生は毎年2000人前後認められるが、血清型別にはO157による患者の発生がO26の3～4倍の割合で起こっている。それに対して、宮城県では各年度ともO26の患者発生数がO157の発生数を上回り、全国の傾向とは異なっていることが判明した (図1)。

#### 3.2 検出菌のVT産生性

過去5年間に発生したEHEC感染133事例から分離された菌をVT産生性により分類すると、VT1のみを産生する株が最も多く、その9割がO26であった。逆にVT2を産生する60株のうち9割をO157が占めており、O157以外の血清型ではO121が3株、O26が1株であった。また、VT2バリエーションの遺伝子を保有していたのはO157のみで、56株のうち15株で確認され、その型はすべてVT2c

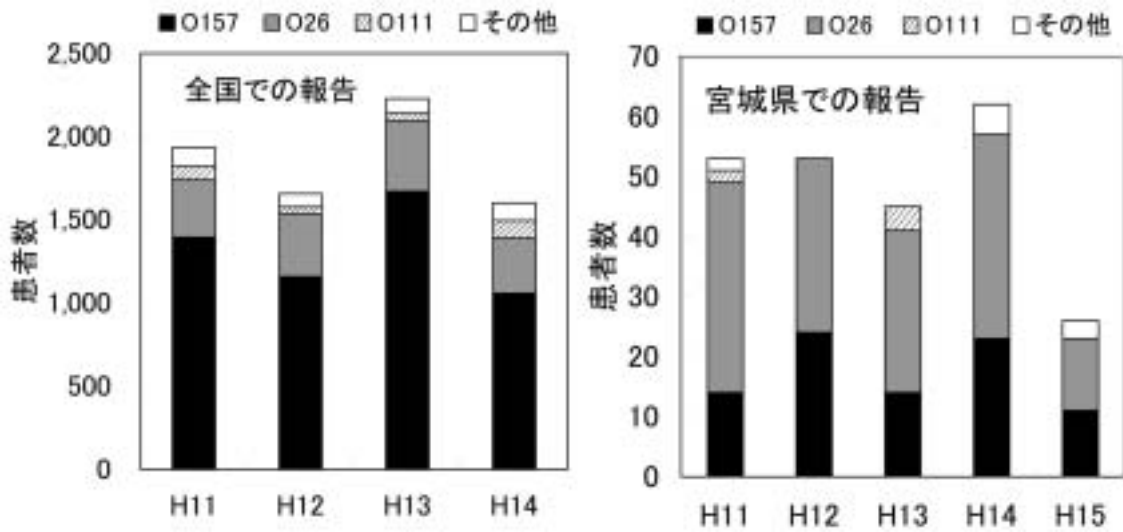


図1 全国と宮城県のEHEC検出状況

表1 検出菌のVT産生性

	O157	O26	O111	O121	O55	計
VT 1	0	67	5	0	1	73
VT 2	11	0	0	3	0	14
VT 1 + VT 2	30	1	0	0	0	31
VT 2c	5	0	0	0	0	5
VT 1 + VT 2c	5	0	0	0	0	5
VT 1 + VT 2c	5	0	0	0	0	5
計	56	68	5	3	1	133

表2 検体別のEHEC検出数

検体名	検査数	陽性数	検出率(%)
健常者便	888	84	9.5
食品	419	0	0
ふき取り	516	1	0.2
井戸水	21	0	0
牛糞便	56	7	12.5

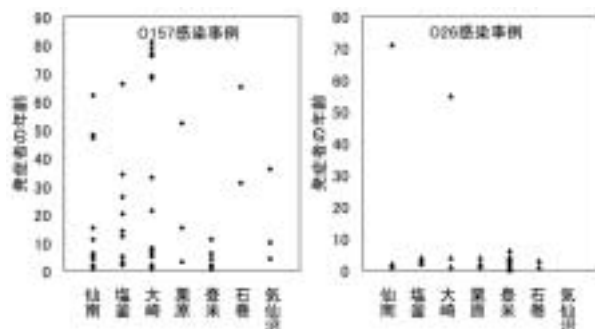


図2 患者の年齢と検出菌の血清型

であった。これらのことから、保有するVT遺伝子の種類は血清型と密接な関係があると考えられた(表1)。

### 3.3 患者と原因菌の血清型、及び産生する毒素型との関連

EHEC発症者のうち、O157とO26が検出された患者の年齢分布を図2に示した。O157は、いずれの年齢層にも分布していたが、O26は、2人の患者以外はすべて6歳以下の幼児に発生しており、中間の年齢層には分布してい

なかった。この要因として、O157とO26の産生する毒素による病原性の違いが考えられ、VT2がVT1より毒性が強いことからVT2産生株が多いO157は幅広い年齢層で症状を引き起こすことが理由の一つであると考えられた。

### 3.4 食品やふきとり材料からのEHEC検出数

EHEC感染症の感染経路を明らかにするために患者家族、井戸水、食品、ふき取り材料及び家畜からの検出状況を調査したところ、患者と接触した家族等の健常者便からは9.5%で菌が検出されていたが、食品・ふき取り・井戸水からはほとんど分離されなかった。しかし、畜産農家での事件の場合には飼育している牛の糞便の12.5%から菌が検出されており、そのパルスフィールドゲル電気泳動(PFGE)パターンは常に患者由来株と一致していた(表2)。

### 3.5 牛に由来するEHECの毒素遺伝子型分類

牛由来のEHECについて特徴を知るため、平成12年度から14年度に行った感染症検査及び調査研究で牛から分離した7株について毒素型の分類を行った。牛由来O157は7株中3株でVT2バリエーションが確認され、その型はヒトから検出されたものと同じVT2cであった(表3)。

### 3.6 EHEC感染症患者発生数と牛飼育頭数

平成11年度から15年度までのEHEC感染症患者発生数と牛飼育頭数を保健所別に示した(図3)。

EHEC患者数は仙南と登米で多く約70件の発生があった。しかし、石巻と気仙沼での発生は少なく、仙南・登米の10分の1以下であった。また、牛飼育頭数は仙南、大崎、登米が多く、石巻、塩釜、気仙沼は10,000頭以下であった。さらに、仙南、栗原、登米はO26での発生件数が多く、逆に大崎、石巻、気仙沼はO157の患者の割合が多く認められた。EHEC感染症の発生が多い仙南、登米では牛の飼育頭数も多く、EHECが少ない石巻、気仙沼では牛も少ないという傾向がみられることから、牛が感染源として深く関わっていることが示唆された。

## 4 考 察

EHEC感染症は、食原因によって、あるいはヒト-ヒト感染が容易に成立する特殊な感染症であるため、その予防は困難である。

県内でも年間約50名の患者が発生し、その季節は春から秋までの長期にわたっている。今回、過去5年間の

表3 患者および牛由来EHECの毒素遺伝子型

保有毒素のタイプ	患者由来O157	牛由来O157
VT 1	0	0
VT 2	11	0
VT 1 + VT 2	30	4
VT 2 c	5	1
VT 1 + VT 2 c	5	2
VT 1 + VT 2 c	5	0
計	56	7

EHECの検出状況をまとめたところ、県内のEHEC感染症の発生傾向について興味深い結果を得た。原因血清型から見ると、全国的にはO157の患者発生がO26を上回っているにも関わらず、宮城県では各年度ともO26の患者発生数が多かった。これは、宮城県が畜産県であることと関連が深いと思われる。その理由の一つには、EHEC感染症患者発生数と牛飼育頭数を調べてみると、牛の飼育頭数が多い地域ではEHEC感染症が多く発生し、その主な原因血清型はO26であった。逆に、EHEC感染症が少ない地域では牛の飼育頭数も少なくO157が主な原因である傾向がみられたことである。また、牛の飼育頭数に関わらずO157感染症発生の割合が高い地域は都市部であることなど、宮城県のEHEC感染症の発生傾向は牛が感染源として深く関わっていることを推察させる。さらに、平成12年度から15年度までのEHEC感染事例95件のうち、牛飼育世帯での発生数は17件、非牛飼育世帯で発生した事例数は78件であったが、県内の酪農世帯数から感染の危険率を計算すると「牛飼育」世帯のEHEC感染症発生率は「非飼育」世帯の10倍高く、これも前述の推察を支持するものと思われる。

よって、当県でのEHEC感染の予防策としては、子供や病気に罹患している人などがいる世帯や牛を飼育している世帯に対し、手洗いの徹底などの基本的な注意が重要であると思われる。

## 5 ま と め

- (1) 宮城県のEHEC検出数は、O26がO157を上回り、全国の傾向とは異なっていた。
- (2) O26患者の多くは6歳以下であり、O157患者の年齢分布とは違いが見られた。
- (3) 牛の飼育頭数が多い地域はEHEC感染症の発生率も高く、飼育牛が感染源となる可能性が高いことが示唆された。

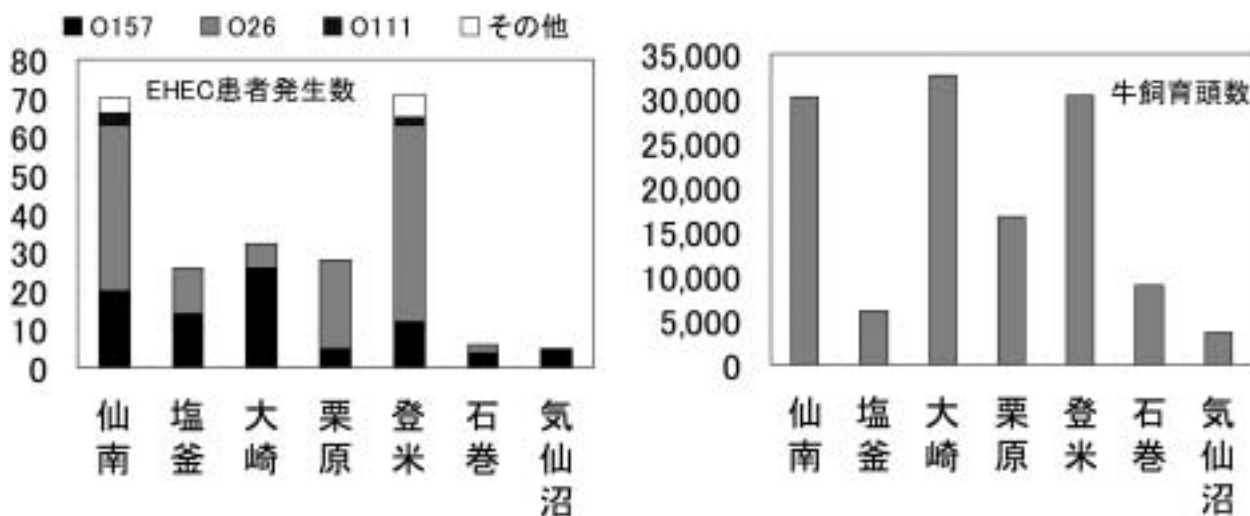


図3 保健所別EHEC患者数と牛飼育頭数

### 参 考 文 献

- 1) 伊藤友美, 有田富和, 齋藤紀行, 御代田恭子, 秋山和夫, 白石廣行:宮城県保健環境センター年報, 17, 51 (1999).
- 2) 山口友美, 有田富和, 畠山敬, 齋藤紀行, 秋山和夫, 白石廣行:宮城県保健環境センター年報, 18, 61 (2000).
- 3) 齋藤紀行, 佐々木美江, 山口友美, 有田富和, 畠山敬, 白石廣行:宮城県保健環境センター年報, 19, 55 (2001).
- 4) Tayler S.D., W.M.Johnson, H.Lior, G.Wang and K.R.Rozee : *J.Clin.Microbiol.*, 40, 345 (1996).

# 配管内におけるレジオネラ属菌の推移

## Transition of the *Legionella* in Piping

佐々木 美江 田村 広子 山口 友美\*<sup>1</sup>  
菅原 直子 佐藤 由美 畠山 敬  
御代田 恭子\*<sup>2</sup> 秋山 和夫

Mie SASAKI, Hiroko TAMURA, Yumi YANAGUCHI  
Naoko SUGAWARA, Yumi SATO, Takashi HATAKEYAMA  
Yasuko MIYOTA, Kazuo AKIYAMA

これまでの調査からレジオネラ属菌を除去するためには、浴室内の電動ブラシ等を使用した清掃や薬剤消毒が効果的であることを確認したが、完全にレジオネラ属菌を除去することは出来なかった。そこで、施設の配管系統内の清掃・消毒とレジオネラ属菌生息状況の推移を確認した結果、配管も浴室内と同様に定期的に清掃・消毒することがレジオネラ属菌汚染防止対策を構築するために有効であると考えられた。

キーワード：レジオネラ；配管；塩素消毒

**Keywords** : *Legionella* ; piping ; chlorination

### 1 はじめに

平成12年以降、公衆浴場を感染源としたレジオネラ症の集団感染が報告され社会的問題<sup>1)2)</sup>として、その対策は急務である。現行の水質基準では、浴槽水から「レジオネラ属菌は検出されないこと(10cfu/100mL未満)」となっており、対策としては塩素系薬剤の使用を奨励している。しかし、温泉水を使用している場合、泉質等により遊離残留塩素濃度を規定量に保持することは難しく、塩素系薬剤のみでレジオネラ属菌の汚染防止を徹底することは不可能と考えられた。

そこで平成12年から14年度までレジオネラ属菌汚染防止対策を模索したところ、塩素系薬剤の使用と物理的清掃を併用することが効果的であることを確認した。しかし、この方法でもレジオネラ属菌を完全に除去出来ない施設があり、さらにレジオネラ属菌の生息を詳細に知る必要が考えられたため、配管内のレジオネラ属菌の汚染状況および清掃方法について検討した。

### 2 材料および方法

X施設およびY施設の2施設を対象に清掃前後の浴槽水・配管のぬめり・浴槽周辺のぬめりを定期的に採取し、定法<sup>2)</sup>に従ってレジオネラ属菌検査を実施した。両施設における検体採取場所は図1および図2、清掃方法は表

\* 1 現 拓桃医療療育センター

\* 2 現 動物愛護センター

1に示した。

#### 2.1 X施設

##### 2.1.1 調査時期と清掃方法

平成15年7月3日に調査を開始した。調査開始前の清掃状況は、排水後、浴槽を洗浄する①法を週2回行い、配管は調査開始時の約2ヶ月前に分解しスポンジで配管内を洗浄するA法を実施していた。そこで7月3日はA法から薬剤消毒を清掃工程に加えたB法を、B法にさらに清掃工程を加えたC法を8月5日に行い、調査を実施した。配管清掃後は、次回の配管清掃まで従来どおり①法を週2回行い1週間毎に定期検査を実施した。

##### 2.1.2 検体

No.1, 2の浴槽水は清掃前後に採取し、併せてNo.3の浴槽周辺のぬめりも採取した。

配管は、No.4から7までの配管洗浄に使用したスポンジ、No.8と10の配管は清掃後・消毒前又は清掃・消毒後にガーゼでぬめりを採取した。また、No.9のヘアキャッチャーは、たまり水を採取し、8月5日の配管清掃後にはNo.8配管とNo.11送湯ポンプのぬめりをガーゼでふきとり、検体とした。

#### 2.2 Y施設

##### 2.2.1 調査時期

平成15年6月30日から開始し、約2ヶ月調査を実施した。

Y施設は温水による配管清掃・消毒のD法を約1週間毎

に行い、7月24日にはD法より温水温度を高くしたE法を行い、調査は配管清掃日に実施した。

2.2.2 検体

浴槽水は、X施設と同様に採水し、No.6の浴槽周辺のぬめりも同時に採取した。

配管は、清掃・消毒前に浴槽へ開口しているNo.3の配管およびヘアキャッチャー近くのNo.4の配管のぬめりをガーゼでふきとり、検体とした。また、No.5のヘアキャッチャーからたまり水を採取した。

3 結果および考察

3.1 X施設

3.1.1 浴槽水と浴槽周辺の汚染状況(図3)

7月3日清掃前のNo.1浴槽水はレジオネラ属菌が

1,220cfu/100mL検出されたのに対し、B法清掃直後に貯湯したNo.2浴槽水では120cfu/100mLまで菌数は減少したが、B法では完全にレジオネラ属菌を除去できなかった。その後、週2回①法による清掃を継続し、1週間毎に行った検査の結果、清掃直後では菌数は減少する傾向であったが、清掃前のNo.1浴槽水の菌数は7月3日の配管清掃後、日数経過に伴い増加することが確認された。

このことからB法と①法による清掃ではレジオネラ属菌を除去する効果が低く、持続期間も少ないと考えられた。

この原因を追求したところ、7月3日にはNo.10のL字管を清掃していなかったこと、浴槽内に清掃していない配管が2ヶ所開放されてあったこと、配管清掃後の洗浄が不十分のため、貯湯時に浴槽内に配管内の有機物等が混入したこと、など清掃が不十分であったことが判明し

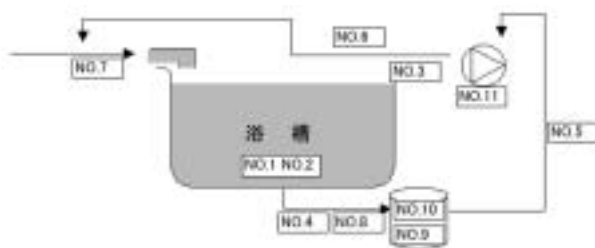


図1 X施設の検体採取場所



図2 Y施設の検体採取場所

X施設			(配管内清掃)	
A法	B法	C法	D法	E法
完全排水	完全排水	完全排水	一部排水(水位を半分くらい下げる)	一部排水(水位を半分くらい下げる)
↓	↓	↓	↓	↓
クレンザー・デッキブラシ清掃	クレンザー・デッキブラシ清掃	クレンザー・デッキブラシ清掃	41℃10分間循環	41℃10分間循環
↓	↓	↓	↓	↓
スポンジ清掃	スポンジ清掃	スポンジ清掃	完全排水	完全排水
↓	↓	↓	↓	↓
	消毒(次亜塩素酸ナトリウム濃度30mg/L) 2時間	消毒(次亜塩素酸ナトリウム濃度30mg/L) 2時間	水圧洗浄	水圧洗浄
↓	↓	↓	↓	↓
浴槽内流水	浴槽内流水	浴槽内流水	半量貯湯	
↓	↓	↓	↓	
貯湯	貯湯	貯湯	50℃10分間循環	
			↓	
			完全排水	
			↓	
			浴槽の半量貯湯	
			↓	
			消毒(50℃1から2時間循環)	消毒(58℃1から2時間循環)
			↓	↓
			貯湯	貯湯

表1 清掃状況

た。

そこで、8月5日に改善方法としてC法による浴槽や配管清掃を実施した結果、当日の清掃直後ではレジオネラ属菌が検出されず、その後の①法を実施しながらの経過では、検出頻度は少なくなり、明らかにC法による清掃は効果があったと考えられた。

一方、浴槽周辺のぬめりからは7月3日の清掃前に検出されたのみで、クレンザー・デッキブラシ清掃は浴槽周辺部の汚染防止には効果が認められた。

### 3.1.2 配管およびヘアキャッチャーの汚染状況

配管各部のレジオネラ属菌検出状況は、7月3日の調査ではヘアキャッチャー通過後のNo.5配管は陰性であったが送湯ポンプを通過したNo.6, 7配管では陽性を示し、送湯ポンプがレジオネラ属菌に汚染されている可能性が示唆された。そこで8月5日には配管清掃・消毒に加え、ポンプ清掃を実施した後、No.11の送湯ポンプを検査した結果、陰性となりこの部分での清掃の必要性を確認した。(表2)

また、ヘアキャッチャーやNo.10のL字管は配管清掃を実施した8月5日には菌が検出されなかったが、日数経過に伴い徐々に菌数が増加したことから、定期的な全配管システムの清掃の必要性も確認した。(図4)

### 3.2 Y施設

6月30日、7月8日、14日の配管清掃前後のNo.1, 2の浴槽におけるレジオネラ属菌は、清掃後の菌数が多くなり、配管からも高い頻度でレジオネラ属菌が検出された。(表3)

この原因として、温水で配管消毒後、浴槽内を清掃せずに貯湯するため、配管内のレジオネラ属菌が浴槽水に

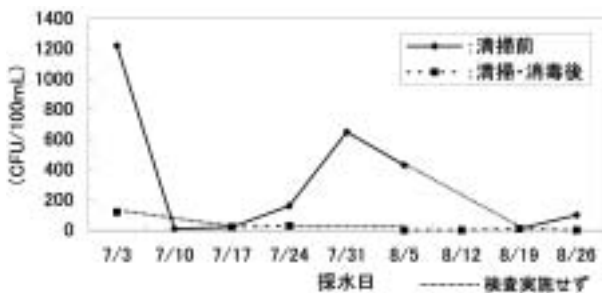


図3 浴槽水の菌数推移

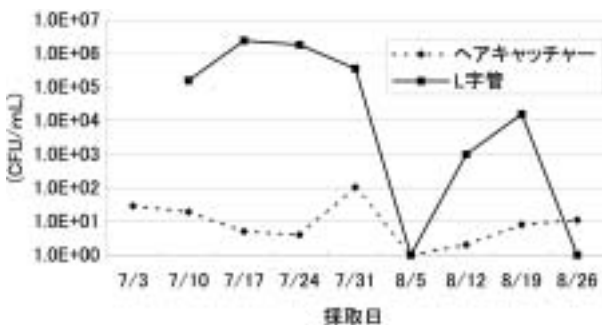


図4 配管内の菌数推移

混入・停滞した可能性が示唆された。そこで、配管消毒後に再度、浴槽内をクレンザー・ブラシで洗浄すること、消毒用温水の温度を可能な限り上げて行うこと、などE法による清掃を指導した。その改善を行った7月24日以降のE法による配管清掃前後の浴槽水は陰性、又は、それ以前と比較して極めて少ない菌数となり、配管をスポンジ等で清掃することなく、E法によってレジオネラ属菌を減少させることが可能であった。(図5)

2施設について施設の状況に応じた清掃方法を検討しながら、レジオネラ属菌の除去・減少に取り組んだ結果、3年間の成果<sup>3)~5)</sup>から明らかのように、浴槽周辺のレジオネラ属菌除去には、ブラシ等の物理的清掃が有効であることが再確認できた。しかし、施設全体からレジオネラ属菌を除去するためには、ヘアキャッチャーやポンプを含めた全ての配管システム(循環システム)を十分に清掃・消毒することが重要であり、さらに定期的且つ正確に清掃を実施することが必要と考えられた。

表2 X施設の汚染状況

NO	採取場所	検査日	
		7月3日	8月5日
4	配管	+	+
5	配管	-	-
6	配管	+	+
7	配管	+	+
8	配管	+	+(-)
9	ヘアキャッチャー	+	+
10	L字管		+
11	送湯ポンプ		-
清掃方法		B法	C法

( ): 配管清掃後  
 ■ : 配管清掃時、採取  
 □ : 配管清掃後、採取

表3 Y施設の汚染状況

NO	採取場所	6月30日	7月3日	7月8日	7月14日	7月24日	7月30日	8月26日
1	浴槽	-	+	+	-	-	-	+
2	浴槽	-	+	+	-	-	-	+
3	浴槽	-	+	+	-	-	-	+
4	浴槽	-	+	+	-	-	-	+
5	ヘアキャッチャー	+	+	+	+	-	-	+
6	浴槽周辺		+	+	-	-	-	-
清掃方法		D法		D法	D法	E法	D法	D法

■ : 配管清掃時、採取  
 □ : 配管清掃後、採取

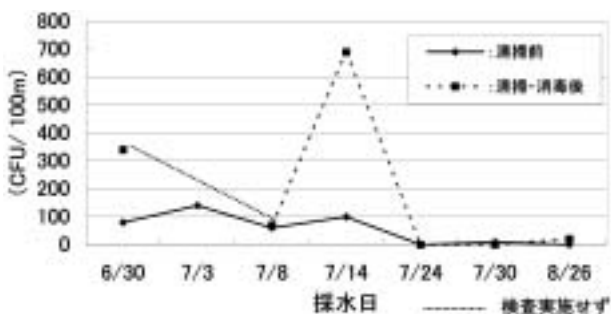


図5 Y施設の浴槽水の菌数推移



#### 4 ま と め

- (1) 定期的な配管系統の物理的な清掃および消毒は有効である。
- (2) 浴槽内の清掃・消毒手順を考慮すると清掃効率が高くなる。
- (3) 高温水による消毒を定期的に行うことは有効である。

#### 参 考 文 献

- 1) 遠藤卓郎他:東京都予防医学協会年報, 30, 218(2001).
- 2) 藪内英子他:感染症学雑誌, 78, 90 (2004).
- 3) 厚生省生活衛生局企画課:“新版レジオネラ防止指針”(1999)(財団法人ビル管理教育センター).
- 4) 佐々木美江他:宮城県保健環境センター年報, 19, 62 (2001).
- 5) 佐々木美江他:宮城県保健環境センター年報, 20, 64 (2002).
- 6) 佐々木美江他:宮城県保健環境センター年報, 21, 56 (2003).

## 砂ろ過海水と電解海水を用いたカキ浄化試験

### Oyster Purification test in Sand filtration sea water and Electrolysis sea water

山木 紀彦 植木 洋 伊藤 大介\*<sup>1</sup>  
文谷 俊雄\*<sup>2</sup> 菊地 奈穂子 後藤 郁男  
沖村 容子 秋山 和夫

Norihiko YAMAKI, Yo UEKI, Daisuke ITO  
Toshio BUNYA, Naoko KIKUTI, Ikuo GOTO  
Yoko OKIMURA, Kazuo AKIYAMA

カキに一定濃度のFCV F4を頻回添加し、取込みウイルス量の推移を定量PCR法で確認した。さらに、FCV F4が取り込まれたカキを用いて、砂ろ過海水および電解海水によるウイルス除去について検討を行った。その結果、カキへのウイルス取込は、添加量とほぼ同じウイルス量 $1.00 \times 10^5$  copies/g以上維持された。また、砂ろ過海水と電解海水での浄化試験では、浄化72時間後でも中腸腺からFCV F4が検出され、効果的なウイルス除去は認められなかった。

キーワード：ノロウイルス、ネコカリシウイルス、浄化試験、砂ろ過海水、電解海水

**Keywords** : *Norovirus* ; *Feline calicivirus F4* ; purification test ; sand filtration sea water ; electrolysis sea water

## 1 はじめに

宮城県では、食中毒原因物質<sup>1)~3)</sup>の1つであるノロウイルス (*Norovirus*:NV) のカキからの浄化を検討しており、これまで、NVの代替ウイルスとしてネコカリシウイルス (*Feline calicivirus F4*:FCV F4) を用いて、海中での挙動とカキへの取込試験ならびに砂ろ過海水による浄化試験を行った<sup>4)</sup>。その結果、FCV F4は砂ろ過海水中で120時間にわたり検出された。また、カキ体内に1時間で取り込まれることが確認された。さらに、FCV F4をカキに1回添加し、取込を行い浄化した場合、カキからウイルスを除去するためには72時間以上の浄化時間を要した。

冬季は、NVによる感染性胃腸炎の流行が多く確認される。患者から排泄されたNVは、下水処理場を経て、河川等に放流される。カキのNVによる汚染経路は胃腸炎患者～下水処理場～河川～カキと推定されており、NVによる胃腸炎患者が流行する冬季においては、養殖カキがNVに暴露される機会が多い。このことを考慮し、今回の取込試験は、一定濃度のウイルス量を頻回添加し実施した。また、浄化試験においては、県が定めている「生かきの取扱いに関する指導指針」に基づき、砂ろ過海水および砂ろ過海水を海水電解装置に通過させた海水（以下、電

解海水）を用いて検討したので報告する。

## 2 材 料

### 2.1 供試ウイルス

定量PCR法で測定し、 $8.10 \times 10^8$  copies/mlのFCV F4を用いた。

### 2.2 カキおよび海水

宮城県内のA湾で2年間養殖され、泥や付着物を除去したカキ (*Crassostrea gigas*) を水槽に入れ流水状態で2日間飼育し試験材料とした。なお、カキの飼育、FCV F4取込および浄化試験にはFCV F4汚染のないことを確認した砂ろ過海水を使用した。

## 3 方 法

取込試験および浄化試験は宮城県水産研究開発センター飼育棟で実施した。

### 3.1 取込試験

FCV F4の取込を2004年3月15日から20日まで5日間実施した。砂ろ過海水180Lが入った水槽に $3.00 \times 10^{11}$ 個の植物プランクトン (*Chaetoceros gracilis*: Cg) とウイルス培養液500ml (FCV F4  $8.10 \times 10^8$  copies/ml) を添加し、1時間後にカキ152個体を入れた。その後、48時間毎に同じ条件でCgとFCV F4を添加した水槽にカキを移動し、計120時間取込みを行った。なお、水温は、養殖カ

\* 1 宮城県栽培漁業センター

\* 2 宮城県産業経済部漁場漁港課

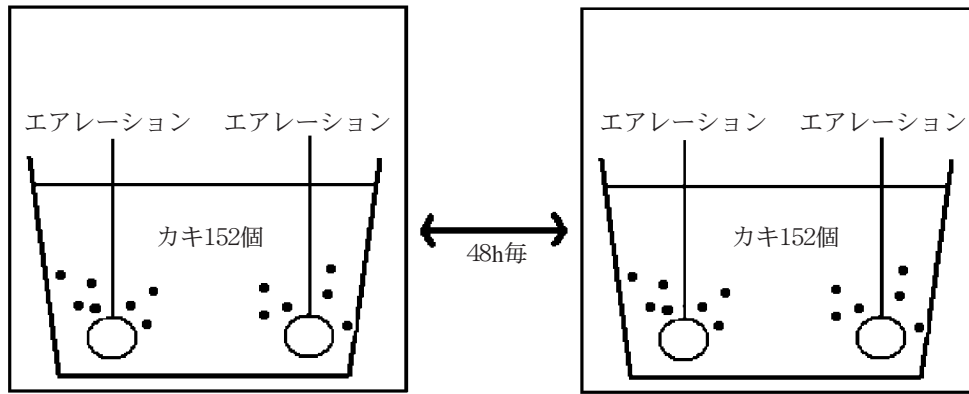


図1 取込試験

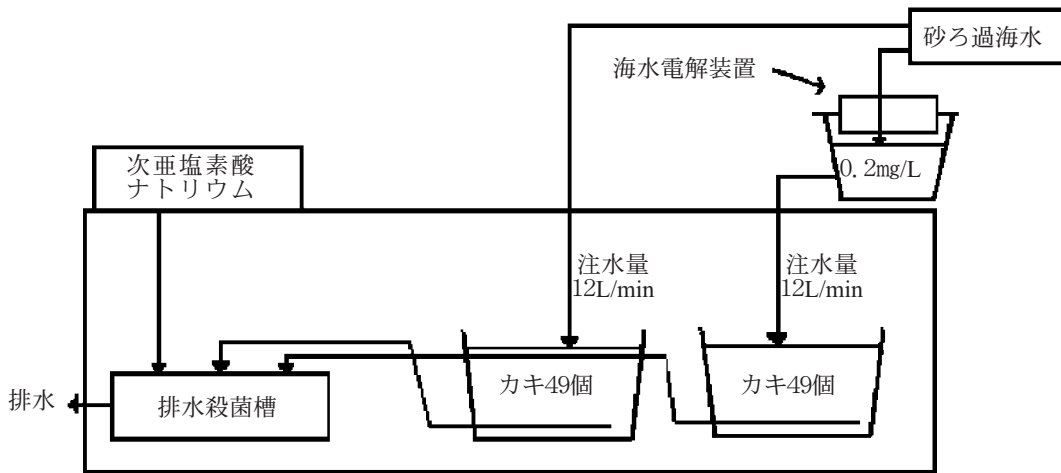


図2 浄化試験

キからNVの検出率が高くなる1月の海水温<sup>5)</sup>を想定し10℃に維持し、エアレーションを行い実施した。

検体は経時的(0, 1, 24, 48, 72, 96, 120時間後)に海水1Lとカキ8個体を採取した。

### 3.2 浄化試験

浄化試験は2004年3月20日から23日までの3日間実施した。

浄化は、180Lの砂ろ過海水および電解海水の水槽に取込試験を行ったカキを49個ずつ水槽に移し開始した。浄化の条件として、流量は、中ら<sup>6)</sup>が行ったポリオウイルスの浄化試験を参考に毎分12Lに設定し、水温は10℃に保ちエアレーションを行った。電解海水は、県が定めている「生食用かきの衛生処理指導基準」に基づき、残留塩素濃度0.2mg/Lに調整し使用した。浄化の確認は、経時的(1, 6, 24, 48, 72時間後)にカキ8個体を採取し、それぞれの検体からFCV F4を定量した。

### 3.3 ウイルス濃縮法

海水はPolyethylene Glycolを最終濃度10%に加え、4℃1晩攪拌後10,000rpm30分間遠心し、沈渣をDW500μlで再浮遊し検体とした。また、カキは個々に中腸腺を取り出し、3.2φのステンレスビーズ入りの5mlチューブに入れ4,500rpm60秒間破碎後、10,000rpm10分間遠心し、上

清140μlを検体とした。

### 3.4 ウイルス定量法

濃縮検体140μlをQIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN)によりウイルスRNAを抽出しDNase処理後、逆転写反応を行いcDNAを作成した後、影山ら<sup>7)</sup>の方法で定量PCRを実施した。

primerとprobeは、forward primer 5'-AGG CGT TAG CGA CGC AAT C-3', reverse primer 5'-CAA CAC TCG GAC TGT CCA TGT T-3'およびprobe 5'-(FAM)-CAA ACC ACC AGT ATG GCC CAA TTC AAG TT-(TAMURA)-3'でFCV F4株 (accession No.D31836)の全塩基配列をもとにPrimer Express (ABI)で設計した。

定量PCR条件は、50℃ 2分間と95℃ 10分間行い、95℃ 15秒間と57℃ 1分間を40サイクル行った。定量PCR反応は、96-well optical reaction plates (Applied Biosystems)で実施した。検量線は、コピー数既知(1.00×10<sup>10</sup>copies/μl)のFCV F4遺伝子の10倍階段希釈系列を作成し用いた。

## 4 結果及び考察

### 4.1 取込試験

経時的に採取した海水およびカキのFCV F4の定量結

果を図3に示した。海水は、1時間後 $8.10 \times 10^8$  copies/ml、24時間後 $4.50 \times 10^8$  copies/ml、48時間後で $1.07 \times 10^8$  copies/ml、72時間後に $4.54 \times 10^7$  copies/mlと緩やかに減少し、その後は96時間で $7.97 \times 10^7$  copies/ml、120時間で $8.74 \times 10^7$  copies/mlとほぼ同じウイルス量で推移した。

中腸腺での経時的取込量は、設定時間ごとに採取した8個体の個々について定量し、その平均値で示した。取込開始1時間後 $8.37 \times 10^3$  copies/g、24時間後 $2.11 \times 10^5$  copies/g、48時間後 $4.42 \times 10^5$  copies/g、72時間後には $3.39 \times 10^6$  copies/gと増加し、96時間で $3.14 \times 10^5$  copies/gと一度減少し、その後120時間では $1.68 \times 10^6$  copies/gまで増加した。

今回の取込試験は、前回の試験<sup>4)</sup>において、ウイルス培養液2.4Lを1回添加した場合、取込開始120時間後に1/10,000程度に減少したことを考慮して実施した。通常、カキは、養殖海域でNVによる単一暴露は考えられず、冬期に常にウイルスの汚染を受け、カキ体内にウイルスが常在している可能性が高いことから、一定濃度のウイルス量で頻回取り込ませた。また、海水中にウイルス粒子が単一で浮遊していることは少なく、プランクトンなどと凝集塊を形成している可能性が示唆されていること<sup>8)9)</sup>から、植物プランクトンの添加量を $1.80 \times 10^7$ 個から $3.00 \times 10^{11}$ 個に増やして行った。その結果、FCV F4は、海水中で長時間にわたり、ウイルス添加量とほぼ同じウイルス量を維持し、かつ、カキ中腸腺では、取込開始24時間以降、 $10^6$  copies/g以上で推移することが明らかになった。

#### 4.2 浄化試験

浄化試験の結果について図4に示した。カキのウイルス量については、中腸腺5個の平均値で示した。

中ら<sup>6)</sup>が行った浄化試験によると、カキによるポリオウイルスの取込を14日間7回頻回投与した場合は、浄化開始24時間まで急激に浄化されたが、その後は、長時間カキ体内から浄化されなかったとの報告がある。そこで、FVC F4を5日間3回頻回添加した後、カキの浄化試験を実施した。

砂ろ過海水を用いた浄化におけるカキ中腸腺のウイルス量は、浄化開始1時間後 $4.61 \times 10^5$  copies/g、6時間後 $2.02 \times 10^5$  copies/g、24時間後 $5.59 \times 10^5$  copies/gと

$10^5$  copies/gで推移した。浄化48時間後 $9.86 \times 10^3$  copies/g、72時間後 $4.11 \times 10^3$  copies/gと減少した。

次いで、電解海水でのカキ中腸腺におけるウイルス量は、浄化開始1時間後 $2.63 \times 10^5$  copies/g、6時間後 $2.80 \times 10^5$  copies/gと24時間後 $1.53 \times 10^5$  copies/gまで $10^5$  copies/gで推移し、浄化48時間後に $6.96 \times 10^3$  copies/g、72時間後 $2.31 \times 10^3$  copies/gと減少した。

今回、カキから細菌を浄化することを目的とした「生かきの取扱いに関する指導指針」に基づき電解海水と砂ろ過海水を用いてウイルスの浄化を試みた結果、両浄化方法ともにウイルス量は同一のパターンを示し、0時間から72時間後には約1/100程度まで減少したが、完全に除去できなかった。このことは、砂ろ過海水のみを使用した場合と大きな差はなく、電解海水がウイルス浄化に対してはほとんど効果がないことを示唆していた。また、カキの消化器系は、胃と腸で行う細胞外消化、消化盲嚢部が主体となる細胞内消化、変形細胞による消化があるが<sup>8)</sup>、0.2mg/Lの電解海水がカキの消化および排泄に影響を及ぼしていないと考えられた。

今後、NVの海水中での状態を考慮して、今回よりも低濃度FCV F4量の頻回添加でカキへの取込を行い、再現性を確認したうえで浄化方法を検討する必要がある。

### 5 まとめ

今回の取込試験および浄化試験では、ウイルスを頻回添加することにより、カキ中腸腺に長時間同じウイルス量が維持されることが明らかとなった。また、砂ろ過海水による浄化法と電解海水による浄化法では、カキ体内のウイルス浄化が困難であることが判明した。これらの試験は、最終的にNVの浄化を前提に実施しており、今後は本ウイルスを用いて取込状態の再現性、浄化方法について検討を加え、NVの浄化に有用な方法を構築していきたいと考えている。

### 6 謝辞

本試験を行うにあたり、貴重なFCV F4を分与していただいた、東京大学大学院獣医微生物学研究室 遠矢幸伸先生に深謝いたします。

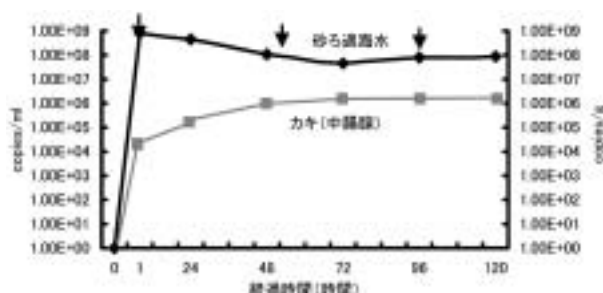


図3 取込試験におけるFCV F4の経時的変化

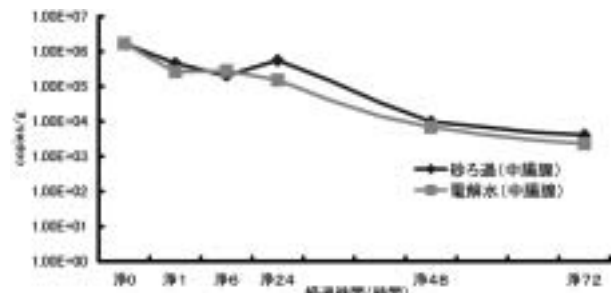


図4 浄化試験におけるFCV F4の経時的変化

## 参 考 文 献

- 1) 永安聖二, 千屋誠造, 小松照子, 上岡英和, 崎本祥仁, 安倍淳介, 堀見雄三, 橋本節夫, 井上泰夫: *Rep.Pub.Hlth.kochi*, **47**, 41 (2001).
- 2) 西 香南子, 杉山 明, 中山 治: 三重県保健環境研究部年報, **46**, 65 (2001).
- 3) 藤田 満, 小川恭正, 寺村 渉: 食品衛生研究, **49**, 123 (1999).
- 4) 山木紀彦, 植木 洋, 伊藤大介, 文谷俊雄, 後藤郁男, 佐藤千鶴子, 渡邊 節, 秋山和夫: 宮城県保健環境センター年報, **21**, 63 (2003).
- 5) 秋山和夫, 野池道子, 佐々木美江, 山口友美, 有田富和, 後藤郁男, 佐藤千鶴子, 畠山 敬, 沖村容子, 斎藤紀行, 白石廣行: 宮城県保健環境センター年報, **18**, 49 (2000).
- 6) 中 正純, 岡田恵美, 岡山あゆみ, 南川藤雄, 米奥正則, 福田美和, 矢野拓弥, 川田一伸, 櫻井悠郎: 食品衛生研究, **50**, 97 (2000).
- 7) T.Kageyama, S.Kojima, M.Shinohara, K.Uchida, S.Fukushi, F.B.Hoshino, N.Takeda, K.Katayama: *Journal of Clinical Microbiology*, **41**, 1548 (2003).
- 8) 今井丈夫: “浅海完全養殖”, p.85(1981), (恒星社厚生閣).
- 9) Y.Yosida, K.Kazuyosi, K.Yabuuchi: *Ann.Rep. Tokyo.Metr.Res.Lab.P.H.*, **39**, 49 (1988).

## 下水処理施設および河川水におけるノロウイルス(NV)の挙動

### The Behavior of *Norovirus* (NV) in the Wastewater Treatment Plant and the River

植木 洋 菊地 奈穂子 山木 紀彦  
後藤 郁男 沖村 容子 秋山 和夫

Yo UEKI, Naoko KIKUCHI, Norihiko YAMAKI  
Ikuo GOTO, Yoko OKIMURA, Kazuo AKIYAMA

感染性胃腸炎の流行期に患者便、下水処理場流入水・放流水および河川水から検出される*Norovirus* (NV) を定量PCR法で測定した。その結果、下水流入水のNV遺伝子数の推移は感染性胃腸炎患者数の増減と連動することが明らかとなった。また、今回調査対象とした下水処理場におけるNVの除去効率は、 $1.3 \log_{10}$ から $2.6 \log_{10}$ であった。

キーワード：ノロウイルス；下水処理場；NV除去効率；定量PCR

**Keywords** : *norovirus* (NV) ; the wastewater treatment plant ; removal efficiency of NV ; Real-time PCR

## 1 はじめに

ノロウイルス (NV) は感染性胃腸炎やウイルス性食中毒の主な病原因子である。NVは1997年に食品衛生法施行規則の一部改正により食中毒病原物質に追加されて以降、NVによる食中毒の実態が明らかになり、特に届け出患者数では平成12年以降平成14年までの毎年、単独の病原物質としては最も多く報告されている<sup>1)2)</sup>。国立感染症研究所の調査によると、NVが原因の食中毒事例において患者数が2名から8名の小規模事例および9名から32名の中規模事例では、34%から41%の事例がかきを原因食品と推定しており、NVによる食中毒はカキの喫食と密接に関係していることを報告している<sup>3)</sup>。NVの養殖カキへの汚染経路について、我々はこれまでに汚染経路の一つとして、ヒト～下水処理場～河川～カキであることをNV遺伝子の分子疫学的解析により明らかにした<sup>4)</sup>。下水処理過程でのNVの挙動に関し、定性的に調査した報告<sup>5)</sup>はあるが定量的に実態を把握した報告は少ない。今回我々は感染性胃腸炎の流行期に患者便、下水処理流入水・放流水、下水放流水が排水されている河川を対象にNVの検出検査を定量PCR法で行い、それぞれの検体から検出されるNVの量的実態把握、下水処理場におけるNVの除去効率の評価を目的に調査を実施したので報告する。

## 2. 材料および方法

### 2.1 材料

2.1.1 感染性胃腸炎患者便：A地区の医療機関で2003年12月1日～2004年1月28日の期間中に採取した26件

2.1.2 下水処理場流入水（以下流入水）：A地区の下水処理場で2003年12月12, 18, 25日, 2004年1月6, 15, 26日に採取した6件

2.1.3 下水処理場放流水（以下放流水）：2.1.2と同時に採取した6件

2.1.4 河川水：A地区の下水処理場放流水が流れ込む同地区内の河川で2003年11月28日, 12月12, 25日, 2004年1月6, 15, 26日に採取した6件

### 2.2 方法

#### 2.2.1 ウイルスの濃縮

イ. 感染性胃腸炎患者便：便は蒸留水で約10%乳剤を作成し、10,000rpm, 10分間遠心後上清をウイルス抽出液とした。

ロ. 下水流入水・放流水, 河川水：検体1 Lにpolyethylene Glycol 100 g, NaCl 23g加え4℃で一夜攪拌後、10,000 rpm, 30分間遠心した。上清を吸引除去後、沈渣を2 mlの蒸留水で懸濁しウイルス濃縮液とした。

#### 2.2.2 ウイルスRNAの抽出

QIAamp Viral RNA mini kit (QIAGEN) でウイルスRNAを抽出した。なおRNA誘出量は60  $\mu$ lとした。

#### 2.2.3 NV遺伝子の検出ならびに定量

影山らの方法<sup>6)</sup>に従った。すなわち抽出したRNAをDNase処理後、Random primerを用いた逆転写反応によりcDNAを作成した。cDNAを鋳型にG I型はCOG1F/R primerおよびRING1-TP (a), RING1-TP (b) probe, G II型はCOG 2 F/R primerとRING 2-TP probeにより定量PCRを行った。

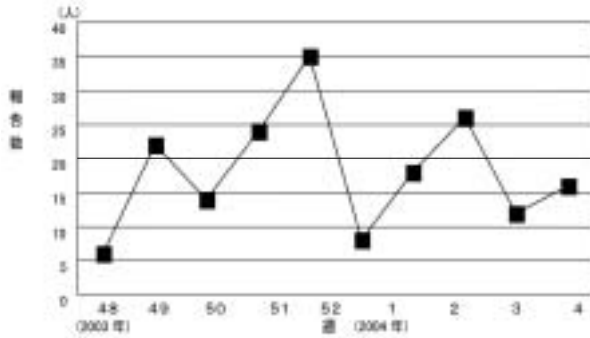


図1 A地区における感染性胃腸炎患者報告数(人)

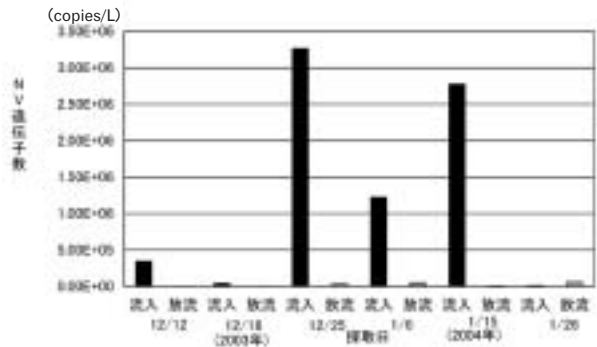


図3 下水処理場流入水および放流水中のNV遺伝子数の推移

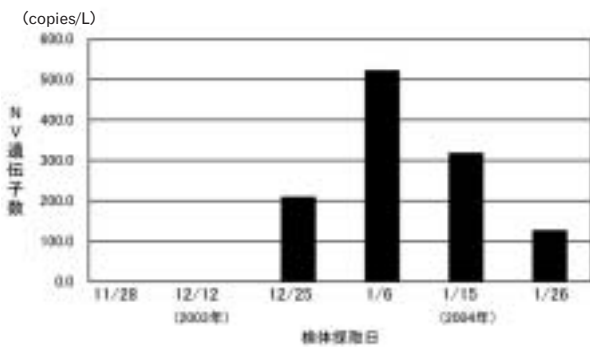


図2 河川中のNV遺伝子数の推移

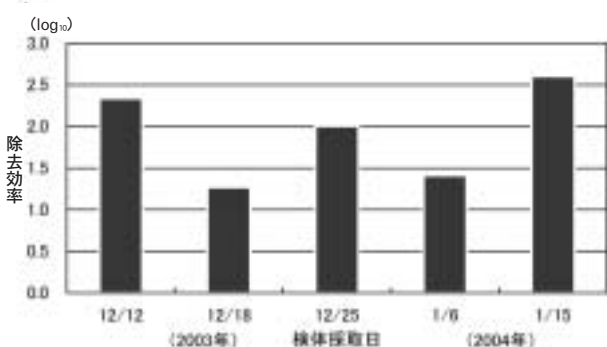


図4 下水処理場でのNVの除去状況

### 3 結 果

#### 3.1 A地区における感染性胃腸炎患者の推移

A地区における感染性胃腸炎患者数は、2003年の第48週（11月24日から11月30日）まで10人以下で推移していたが、49週から急増し第52週（12月22日から12月28日）にピークに達した（図1）。

調査期間中、感染性胃腸炎と診断された患者26名より糞便を採取し病原因子を検索した結果、16名（61.5%）からNV遺伝子が検出され、この期間に流行が認められた感染性胃腸炎の主な病原物質はNVであることが確認された。

#### 3.2 各種検体から検出されたNV遺伝子数

##### 3.2.1 感染性胃腸炎患者便

感染性胃腸炎患者便26件を対象に定量PCR法によるNV遺伝子の検出検査を行った結果、陽性便1gに含まれるNV遺伝子数は、最も少ない検体で $1.9 \times 10^2$  copyで最大値は $4.3 \times 10^7$  copyで平均 $5.5 \times 10^6$  copyであった。なお、検出されたNVの遺伝子型はすべてG II型であった。

##### 3.2.2 河川水

河川水からは12月25日以降毎回NV遺伝子が確認された。検出されたNV遺伝子はすべてG II型であった。NVが検出された検体の1L中の遺伝子数は、最大で521.7 copy、最小で126.1 copyであった。（図2）

##### 3.2.3 下水処理場流入水・放流水

流入水および放流水からは調査期間中毎回NV遺伝子が確認された。12月25日、1月6日、15日の流入・放流水、

1月26日の放流水からはG IおよびG II両型のNVが検出された。それ以外に検出されたNVの遺伝子型はすべてG II型であった。流入水1L中のNV遺伝子数の最大値は12月25日に検出された $3.3 \times 10^6$  copyであった。同様に放流水1L中では1月26日の検体から検出された $5.9 \times 10^4$  copyが最大値であった。（図3）なお、1月26日に採水した流入水の定量値が著しく低いのはPEG法でウイルス濃縮した際に、通常確認されない高い粘性が認められ、そのことがウイルスRNAの抽出に影響を及ぼし、定量値に反映されたと考えられる。

#### 3.4 下水処理場でのNVの除去効率

流入水と放流水中に含まれるNV遺伝子を定量し、下水処理場でのNVの除去効率を調査した結果、 $1.3 \log_{10}$ から $2.6 \log_{10}$ の除去が確認された。なお、今回調査を行った下水処理場は流入から放流までの処理時間が通常の状態では約30時間であり、除去効率を確認するためには時間差を考慮する必要があると考えられた。しかし、12月25日、1月6日、15日の調査結果では流入水のNV定量値に大きな変化が確認されなかったことからこの期間中において処理時間の影響は少ないと考えられた。（図4）

### 4 考 察

今回調査対象とした下水処理場は、オキシデーショニング法により処理が行われており、この下水処理場におけるNVの除去効率は、感染性胃腸炎の流行期で $1.3 \log_{10}$ から $2.6 \log_{10}$ と他の腸管系ウイルスの除去効率<sup>7)</sup>と

大きな変化は認められなかった。遺伝子型別の平均除去効率はG I 型が $1.63 \log_{10}$ であったのに対し、G II 型は $1.90 \log_{10}$ とG II 型の方がやや高い値であった。佐野らは下水処理場の活性汚泥中にPolio virus binding-protein (PBP)の存在を明らかにしている<sup>8)</sup>。G I 型とG II 型の除去効率の差が同じ様なメカニズムから生じるか否かについては興味深い問題である。

下水流入水でのNVの消長は、この地区の胃腸炎患者数の増減と同じような挙動を示しており、両者の間には密接な関連が推測された。

カキの浄化法については現在検索中であり、画期的な方法の確立までにはまだ時間を要すると考えられる。今回の調査結果より、養殖カキのNV汚染リスクを抜本的に軽減するためには、カキへ蓄積されるまでのメカニズムの解明はもちろんのこと、汚染経路の一つである下水処理過程でのNVの除去は重要であると示唆された。

## 参 考 文 献

- 1) 厚生省生活衛生局長通知“食品衛生法施行規則の一部を改正する省令の施行について”平成9年5月30日, 衛食第155号 (1997).
- 2) 厚生労働省“食中毒・食品監視関連情報”, <http://www.mhlw.go.jp/topics/syokuchu/>, (2004. 2. 23).
- 3) 国立感染症研究所: 病原微生物検出情報, 20, 265 (1999).
- 4) 植木 洋, 秋山和夫, 渡部 徹, 大村達夫: 環境工学論文集, 40, 607 (2003).
- 5) 全国ウイルス性食中毒研究班: “厚生科学特別研究事業平成11年度研究報告書”, (2000) (厚生科学特別全国ウイルス性食中毒研究班).
- 6) Kageyama, T., S.Kojima, M.Shinohara, K.Uchida, S.Fukushi, F.B.Hoshino, N.Takeda, and K.Katayama: *Appl.Environ.Microbiol.*, 41, 1548 (2002).
- 7) Y. C. Leong: *Water Science and Technology*, 15, 91 (1983).
- 8) Daisuke, S., T.Matsuo, and T.Omura: *Appl. Environ. Microbiol.*, 70, 3434 (2004).



# おたふくかぜワクチン接種後に発症した無菌性髄膜炎の一症例

## A Case of Aseptic Meningitis after Inoculation of Mumps Vaccine

菊地 奈穂子 山木 紀彦 後藤 郁男  
植木 洋 沖村 容子 秋山 和夫  
小林 康子\*<sup>1</sup>

Naoko KIKUCHI, Norihiko YAMAKI, Ikuo GOTO  
Yo UEKI, Yoko OKIMURA, Kazuo AKIYAMA  
Yasuko KOBAYASHI

おたふくかぜワクチン接種後に無菌性髄膜炎を発症した患者の病原体検索を依頼され、患者髄液からムンプスウイルスのワクチン株のひとつである星野株を検出した。ワクチン副反応による無菌性髄膜炎の発生率は自然罹患時の発生率と比べて大変少ない頻度とされているが、今回の症例から、稀ではあるが依然として存在しており、ワクチン接種後の経過観察および病原体検索時における患者情報の収集が重要であると思われた。

キーワード：無菌性髄膜炎；ムンプスウイルス；ワクチン；星野株

**Keywords** : aseptic meningitis ; mumps virus ; Vaccine ; Hoshino strain

### 1 はじめに

おたふくかぜ（流行性耳下腺炎）はムンプスウイルスによって起こる感染症であり、発熱、耳下腺の腫脹などを主症状とする。小児に好発し、患者年齢は4歳以下が約50%を占め、6歳までに60%が罹患する<sup>1)</sup>。不顕性感染も多く、大部分は比較的軽症で予後良好であるが、稀に無菌性髄膜炎や脳炎等の神経系疾患を起こし、高度難聴などの後遺症が残る危険性もある。そこで、感染予防のために任意のワクチン接種が行われている。ワクチンによる抗体陽転率は90~98%で、保育園でおたふくかぜが流行した時のワクチン有効率（星野株）は90%との報告もある<sup>2)</sup>。しかし、ワクチン使用にあたって万全の注意を払っても、副反応の起こる可能性が完全には否定できないことから、ワクチン接種後に発熱や髄膜炎などの副反応様の症状を示した場合、その原因がワクチン株か否かを確認することは臨床的な意義が大きく、「医薬品副作用被害救済制度」の適用にも必要とされている。

今回、拓桃医療療育センターより依頼された無菌性髄膜炎患者の検体から、おたふくかぜワクチン株由来のムンプスウイルスを分離したので報告する。

### 2 材料と方法

#### 2.1 対象

患者は、5歳9か月男児。発達遅滞の障害があり、そ

の集中療育のため平成15年5月1日より拓桃医療療育センターに入所した。6月5日におたふくかぜワクチンを接種後、6月21日に39.5℃の発熱を呈したが、抗生剤・輸液投与等の治療により6月23日解熱した。しかし、6月27日に再度発熱し、39~40℃台の高熱が続いた。血清・髄液検査の結果等から無菌性髄膜炎が疑われ、7月2日より、患者の髄液および咽頭拭い液を検体として病原体検索を実施した。

なお、7月2日に採取された血液および髄液の臨床検査結果は表1のとおりである。髄液の細胞数が多く、リンパ球が100%を占めるなど、無菌性髄膜炎を疑う検査所見が得られている。

表1 患者の臨床検査値（7月2日採取検体）

血 清	白血球	9300/ $\mu$ l	{ 好中球 60% リンパ球 37% 単 球 3%
	CRP	0.10mg/dl	
随 液	細胞数	2,392/ $mm^3$ (リンパ球 100%)	
	蚕 白	36.48mg/dl	
	糖	33mg/dl	
	Cl	112Eq/l	
	LDH	23U/l	

\* 1 拓桃医療療育センター（現 国立療養所西多賀病院）

## 2.2 ウイルスの分離

髄液は直接、また咽頭拭い液は定法どおり前処理を行い、4種類の細胞（HEp-2, LLC-MK2, RD-18s, Vero）へ接種し、36℃で3週間培養を行った。

## 2.3 ウイルスの確認

細胞変性効果（CPE）が出現した培養細胞のウイルス感染を確認するために、赤血球吸着（HAD）試験、赤血球凝集（HA）試験を行った。

HA試験：細胞培養上清を希釈液で段階希釈した後、0.6%モルモット赤血球と混合し室温で60分間反応させ、血球凝集の有無を判定した。

HAD試験：組織培養を行ったプレートから培養液を除き、0.4%モルモット赤血球を加え、4℃で30分反応させた後、Eagle's MEMで4～5回洗浄し、顕微鏡下にて赤血球吸着の有無を確認した。

## 2.4 ウイルスの同定

遺伝子学的手法により同定を行った。組織培養液上清からQIAamp Viral RNA Mini Kit（QIAGEN社製）を用いてRNAを抽出し、ムンプスウイルスのP領域を増幅するプライマー（MVP-95, MVP-105）およびSH領域を増幅するプライマー（SH-EcoR I, SH-Pst I）を用いて2種類のRT-PCRを行った。また、SH領域の塩基配列をBig Dye Terminator Cycle Sequencing Kit（ABI社製）を使用したダイレクトシーケンシング法により決定し、NCBI BLASTによる検索を行った。

## 3 結果および考察

### 3.1 ウイルスの分離

組織培養を3代まで盲継代した結果、髄液を接種したLLC-MK2細胞にのみシンシチウムを伴うCPEが確認された（図1）。無菌性髄膜炎の起因病原体としては、真菌やマイコプラズマなど多種多様なものがあるが、一般的にはウイルス性髄膜炎を指すことが多く、85%がエンテロウイルスによる。エンテロウイルス属は毎年初夏から増加し、夏から秋に向けて流行するパターンをとるため、無菌性髄膜炎もこの傾向をとる<sup>3)</sup>。しかし、エンテロウイルスはLLC-MK2細胞に感染した場合シンシチウムは伴わないため、今回の症例は、エンテロウイルス以外のウイルス感染が考えられた。

### 3.2 ウイルスの確認

ウイルスの細胞感染を確認するために、HA試験を実施したが、凝集が弱くはっきりとは確認できなかったため、HAD試験を行ったところ、陽性であった（図2）。また、HAD試験陽性である、赤血球が吸着した細胞を37℃に1時間反応させたところ、赤血球が遊離したことから、ノイラミニダーゼ活性を持つことも判明した。これらの結果から、分離されたウイルスはパラミクソウイルス科が疑われ、さらに患者がおたふくかぜワクチンを接種したという情報からムンプスウイルスを疑った。

### 3.3 ウイルスの同定

RT-PCRを行った結果、P領域、SH領域ともにムンプスウイルスに特異的な増幅産物（233bpおよび549bp）が確認された（図3）。さらに、分離株のSH領域の塩基配列

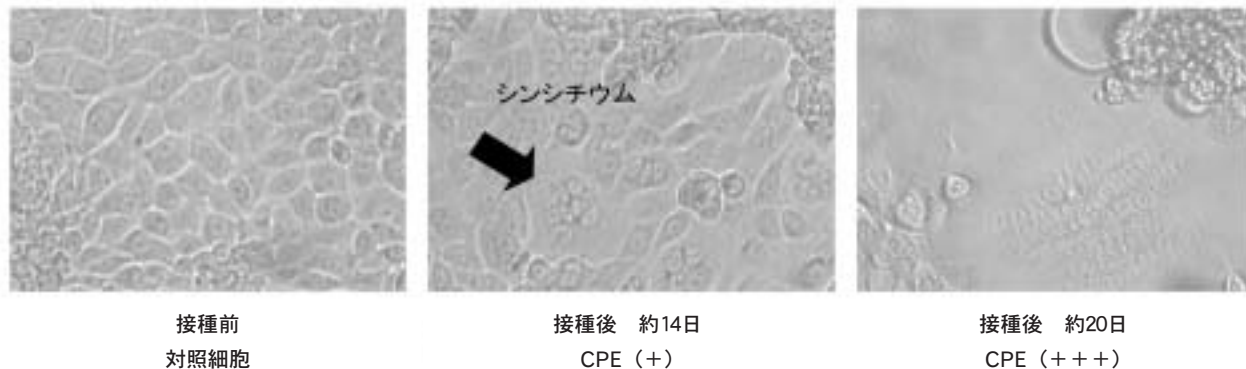


図1 ウイルス分離結果（LLC-MK2細胞）

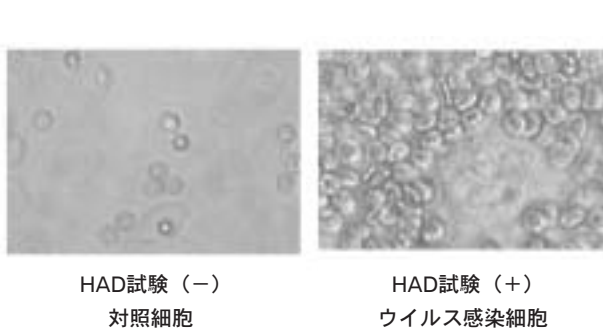


図2 HAD試験結果

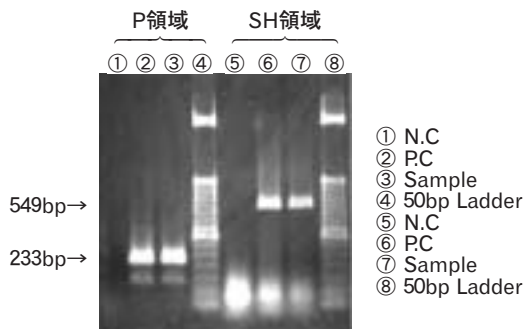


図3 RT-PCR結果

(316bp) をワクチン株と比較した結果、ワクチン株のひとつである星野株と100%一致した。これは、患者に接種したワクチンに使用されている株であり、このことから、今回の無菌性髄膜炎の発症は、ワクチン株由来のムンプスウイルスが原因と考えられた。ちなみに現在日本で使用されている星野株以外のワクチン株である鳥居株、宮原株とは98%の相同性とどまった。

なお、我々の結果報告後に患者主治医が北里生命科学研究所にも検査を依頼し、同一の患者検体についてウイルス分離およびRT-PCR (HN領域)、PCR-RFLPを行い、星野株と同定したとの報告を受けている。これらの結果から、患者は「医薬品副作用被害救済制度」の適用対象として認可され、医療費を給付された。

わが国では、1993年4月にMMRワクチンの使用を中止し、単味おたふくかぜワクチンに移行したのを機にワクチン副反応による無菌性髄膜炎発生が激減した。現在の発生率は2万~12万人に1人とされ、自然罹患時の発生率(4~6%)と比べて大変少ない頻度とされている<sup>1)</sup>。しかし、今回の症例から、ワクチン副反応、特に無菌性髄膜炎は、稀ではあるが依然として存在しており、ワクチン接種後の経過観察が重要であると共に、病原体検索実施時におけるワクチン接種歴などの患者情報収集の重要性を再確認する事例であった。

チン接種後の経過観察が重要であると共に、病原体検索実施時におけるワクチン接種歴などの患者情報収集の重要性を再確認する事例であった。

#### 4 ま と め

- 1) 今回分離されたムンプスウイルスはダイレクトシーケンス法を用いることにより、ワクチン株由来の星野株であることが迅速に確認され、臨床的にも有意義であった。
- 2) 患者は「医薬品副作用被害救済制度」の適用を受けることができた。
- 3) ワクチン接種後の経過観察と病原体検索時における患者情報の収集が重要である。

#### 参 考 文 献

- 1) 国立感染症研究所 厚生労働省健康局結核感染症課：病原微生物検出情報, 24, 103 (2003).
- 2) 庵原俊昭：病原微生物検出情報, 24, 105 (2003).
- 3) 矢口清州：感染症発生動向調査週報, 第12週号, (2003).