

# B 調 查 研 究

## I 論 文

## 宮城県石巻地域で流行した麻疹の流行状況について

## Measles Endemic in Ishinomaki Area of Miyagi Prefecture

情報管理部 ○白取 博志 宇野 和生  
阿部 和男 渡辺 丈夫Hiroshi SHIRATORI, Kazuo UNO  
Kazuo ABE, Takeo WATANABE

キーワード：感染症発生動向調査，麻疹

Key Word：Infectious Disease Surveillance, Measles

2000年11月中旬から翌年にかけて石巻保健福祉事務所管内で流行した麻疹の発生状況を調査した結果、11月中旬に石巻市内及び隣接する矢本町の数カ所の地区で麻疹患者が発生し、さらに翌年にかけて保育園や小学校を介して石巻地域全体に患者が拡大したと推定された。年齢別の患者発生数の調査の結果、わが国の予防接種法の予防接種対象外の12ヶ月未満児が患者の約19%を占めていた。また、調査を実施した患者の約96%はワクチン未接種であることがわかった。

## 1 はじめに

麻疹（はしか）は、中耳炎（7%）、肺炎（6%）、急性脳炎（0.1%）などの合併症をおこす割合が高く、死亡率は先進国でも0.1~0.5%にもものぼるなど、予防対策上重要な感染症であり、WHOもポリオの次に制圧すべき疾患の候補の1つとして位置付けている<sup>1)</sup>。2000年の年間の推定罹患患者数はわが国では約10万人と推定されており、現在でも局地的流行がみられる。一方、米国の年間の罹患患者は100人以下となっており、先進国の中でわが国の罹患患者数はとりわけ多い数値を示している。そこで、今回、2000年11月から2001年1月にかけて石巻地区で局地的に流行した事例について、感染症発生動向調査事業に基づく定点医療機関（定点数は保健所管内の人口割で算定）から報告される麻疹患者のデータ、及び石巻保健福祉事務所管内（以下、石巻管内とする）の定点医療機関から提供を受けた受診患者調査資料を用いて解析を試みたので報告する。

## 2 材料及び方法

2.1. 2000年11月13日~2001年1月31日の期間に石巻管内の定点医療機関を受診した患者の年齢、性別、居住地、通園・通学施設名、受診年月日、予防接種の有無について、定点医療機関から資料の提供を受け、これに基づいて次の調査・解析を行った。

2.1.1. 地図上に患者居住地をプロットし、患者と通学・通園施設との関係について検討を加えながら経時的・地域別に患者発生数の推移を解析した。

2.1.2. 患者の麻疹ワクチン接種の有無と発症年齢の関係を調査した。

2.2. 1997年度~1999年度までの石巻管内の市町別の予防接種率を算出し、地域別の罹患状況との関係について解析した。なお、予防接種率については、各市町が算出した年別の予防接種対象者数に過去2年間の予防接種未接種の積み残し者数を繰り入れて、その中に占める予防接種実施者数の割合を当該年の予防接種率とした。

2.3. 宮城県結核・感染症発生動向調査データを用いて次の調査を行った。

2.3.1. 2000年11月13日（第46週）~2001年2月4日（第5週）の県内の感染症発生動向調査の患者発生データ（週報）を用い、年齢別（6ヶ月未満、12ヶ月未満、1才、2才、3才、4才、5才、6才、7才、8才、9才、10~14才に分類）に患者発生数を調査した。

2.3.2. 1999年（第1週）~2000年（第52週）の県内感染症発生動向調査データにより保健所管内別の患者発生状況を調査し、この期間における経時的・地域的な患者の推移を調査した。

2.4. 2000年~2001年の全国感染症発生動向調査による都道府県別の全国患者集計データ（週報）を用い、宮城県の流行について比較・検討した。

## 3 結 果

3.1. 定点医療機関から提供を受けた受診患者90名について、経時的な推移を調査したところ、2000年11月15日~同月30日の期間に石巻市内及び隣接する矢本町の数

カ所の地区で麻疹患者が連続して発生した。特に石巻市内では万石浦地区でこの期間に6名と多発したのを始め、同地区と隣接する渡波地区で2名、同地区から約5km及び約8kmに位置する湊地区及び門脇地区で各1～3名、矢本町の大曲地区、矢本地区及び赤井地区で各1名ずつ患者発生がみられた。万石浦地区ではその後の患者発生はなかったが、渡波・湊・門脇地区及び矢本町内3地区では、12月に入って連続して患者が発生した。万石浦地

区で11月～1月に発生した6名は同一小学校の学区内に居住し、また、隣接する渡波地区の6名は隣接する別の同一学区内に居住している(図1)。また、次の複数の地区に居住している保育園の園児が同一保育園に通っており、別々の地区の患者に接点がみられた。すなわち湊地区と鹿妻地区、門脇地区と矢本町赤井地区、門脇地区と蛇田地区と南浜地区、及び向陽地区と中里地区の保育園児が通園する共通の保育園がみられた(表1)。

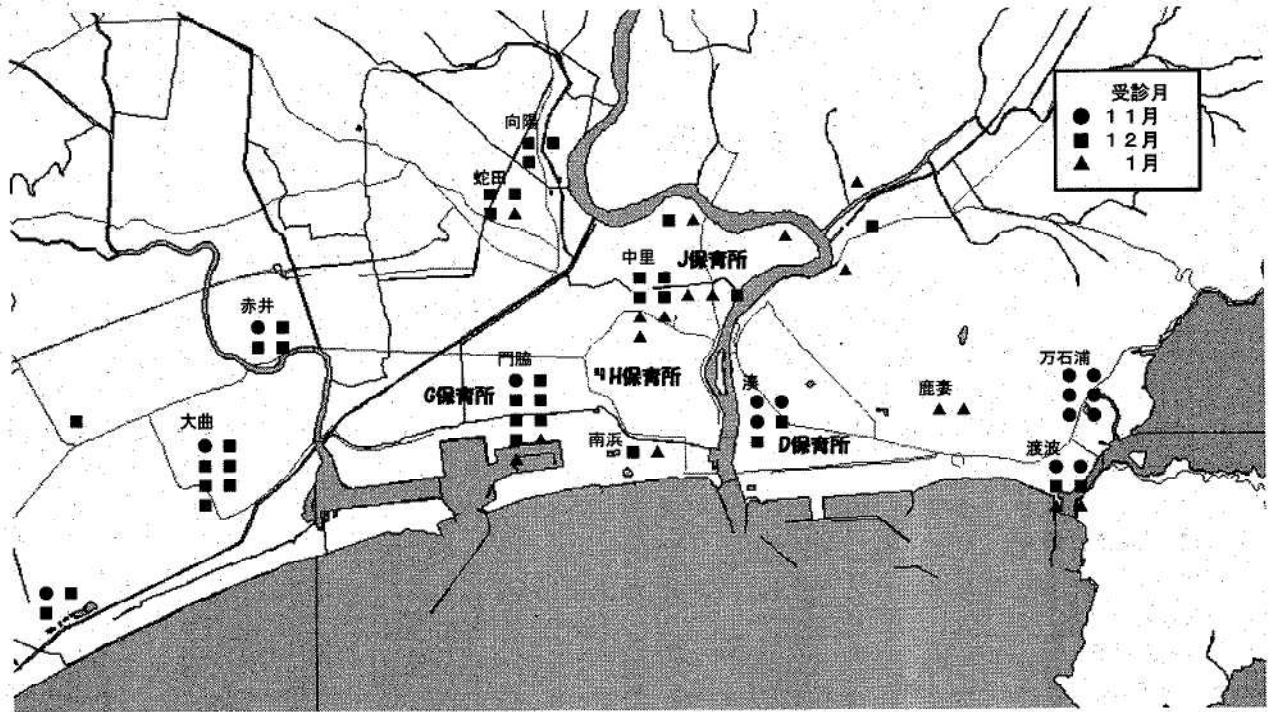


図1 石巻地域における麻疹発生分布

表1 主な地区の通園・通学施設別調査

【矢本町内】

地区	年齢	受診年月日	施設名
赤井	6ヶ月	11月30日	なし
	7ヶ月	12月3日	なし
	2才3ヶ月	12月5日	G保育園 ★
大曲	4才5ヶ月	12月31日	なし
	10才11ヶ月	11月27日	Q小学校
	4才2ヶ月	12月9日	なし
	9才1ヶ月	12月11日	Q小学校
	5才5ヶ月	12月11日	P保育園
曲	11才3ヶ月	12月11日	Q小学校
	8才10ヶ月	12月15日	Q小学校
	4才6ヶ月	12月18日	なし

(注) ★ G保育園  
☆ H保育園  
◎ J保育園  
\* D保育園

【石巻市】

地区	年齢	受診年月日	施設名
蛇田	12才	12月18日	L小学校
	11才11ヶ月	12月20日	L小学校
	6ヶ月	12月28日	H保育園 ☆
	8ヶ月	1月1日	なし
向陽	3才7ヶ月	12月5日	J保育園 ◎
	1才2ヶ月	12月12日	なし
	7才2ヶ月	12月18日	M小学校
門脇	3才8ヶ月	11月15日	なし
	2才7ヶ月	12月9日	G保育園 ★
	11ヶ月	12月18日	なし
	2才7ヶ月	12月18日	H保育園 ☆
	1才2ヶ月	12月18日	なし
	2才	12月25日	G保育園 ★
脇	1才11ヶ月	12月31日	なし
	8ヶ月	1月6日	なし
	8才8ヶ月	1月11日	小学校
	2才10ヶ月	12月16日	J保育園 ◎
中里	6才2ヶ月	12月19日	J保育園 ◎
	1才4ヶ月	12月19日	K保育園
	11ヶ月	12月21日	J保育園 ◎
南浜	6才7ヶ月	1月2日	不明
	1才2ヶ月	1月4日	なし
	1才11ヶ月	1月13日	なし
南浜	2才2ヶ月	12月12日	H保育園 ☆
	10才7ヶ月	1月1日	N小学校

地区	年齢	受診年月日	施設名
万石浦	12才7ヶ月	11月3日	A小学校
	11才3ヶ月	11月15日	A小学校
	10才3ヶ月	11月16日	A小学校
	8才6ヶ月	11月24日	A小学校
	11才2ヶ月	11月27日	A小学校
	10才5ヶ月	11月30日	A小学校
渡波	4才3ヶ月	11月19日	C保育園
	9才1ヶ月	11月28日	B小学校
湊	2才2ヶ月	12月7日	なし
	9ヶ月	12月18日	なし
	11ヶ月	1月13日	なし
鹿妻	1才7ヶ月	11月1日	なし
	2才4ヶ月	11月19日	D保育園 *
	1才1ヶ月	11月27日	なし
	1才2ヶ月	12月9日	なし
鹿妻	11才9ヶ月	12月31日	E保育園
	8才11ヶ月	1月22日	F小学校
鹿妻	4才10ヶ月	1月27日	D保育園 *

3.2. 定点医療機関で調査を実施した90名の患者中、86名が予防接種を受けていなかったが、4名は予防接種を受けていても発症していた。この4名中2名が11才と12才だった。年齢別の患者発生数では、1才が21名と最も多く、6ヶ月～12ヶ月の15名がこれに次いで多かった(図2)。

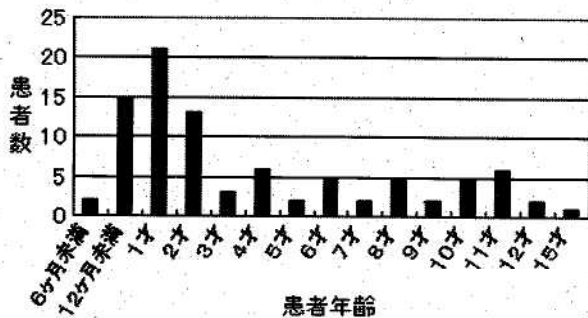


図2 定点医療機関を受診した麻疹患者 (2000年11月～2001年1月)

3.3. 2000年11月13日(第46週)～2001年2月4日(第5週)の県内の感染症発生動向調査の患者発生データ(週報)では、石巻管内の患者発生数は145名であった。年齢別の患者発生状況では、1才が46名(32%)で最も多く、次いで6ヶ月～12ヶ月が23名(16%)であったが、6ヶ月未満でも2名の発症がみられた(図3)。

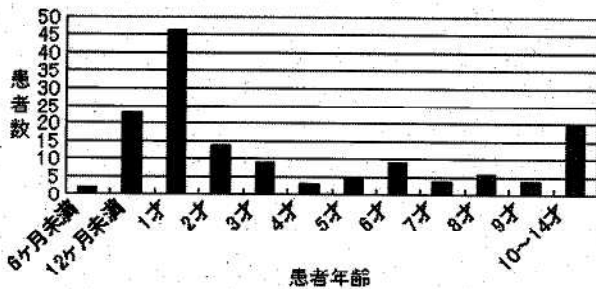


図3 石巻管内の感染症発生動向調査 (2000年11月～2001年1月)

3.4. 今回流行した地域の1999年度の予防接種率は、矢本町では89%と高かったが、桃生町で60%、石巻市で54%、その他の町では40%以下と低率であった(図4)。

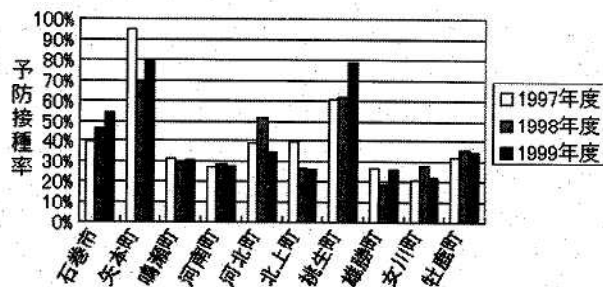


図4 石巻保健福祉事務所管内の予防接種率

3.5. 2000年の第1週～第53週の県内感染症発生動向調査データでは、石巻管内の西側に隣接する登米管内では6月及び9月に患者発生がみられ、登米管内の西側に隣接する栗原管内でそれ以前の1～4月にやや多い患者が発生していることから、今回の石巻地域での流行が栗原管内から登米、石巻へと移動してきた可能性も考えられた(図5、図6)。

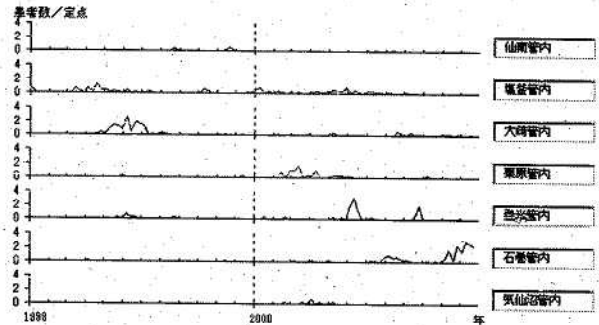


図5 感染症発生動向調査による保健福祉事務所管内別の麻疹の発生状況 (1999年第1週～2000年52週)

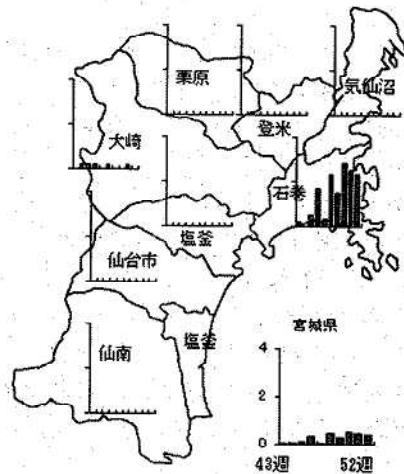


図6 感染症発生動向調査による保健福祉事務所管内別の麻疹発生状況

3.5. 全国感染症発生動向調査による都道府県別の全国患者集計データ(週報)では、2000年の当初より、高知県、奈良県及び九州地方などで大きな流行がみられ、全国的にも過去5年間の同時期と比較して定点当たり患者報告数はかなり多くなっている。東北地方の2000年の第5週の患者データでは、福島県の定点当たり報告数0.73が宮城県の0.22を大きく上回っているなど近隣県からの人の移動による影響も考えられる。

#### 4 考 察

麻疹は身近な小児感染症の中では死亡率も比較的高く、また、重篤になりやすい成人麻疹の発生を促すなど、その予防対策は極めて重要といえる。麻疹の流行を予防するためには、95%以上の高い予防接種率が必要とされているが<sup>2)</sup>、わが国の麻疹予防接種率は先進諸国と比較し

て低く、先進諸国から麻疹の輸出国といわれている。今回の石巻管内の調査でも予防接種率の低い市町が多かったが、患者が多発した石巻市も1999年度の予防接種率は54%と低く、今回の麻疹流行の主要な原因になったものと推定される。これらの結果から麻疹予防のためには各市町村の予防接種率の向上のための施策を積極的に実施することが必要であると痛感した。

また、今回の患者の通園・通学施設の調査では、石巻市万石浦地区の6名や矢本町大曲地区の4名の児童はそれぞれの地区の同一小学校に通っており、今回の流行が学校を介した感染によることも推定される。また、石巻市及び矢本町内の各地区では、居住地区以外の保育園へ患者が通園していることから、別々の地区の園児が保育園を介して感染し、その後それぞれの地区内の家庭等を介して小規模な流行をもたらしたものと推定される。このように保育園や小学校が今回の流行に大きな役割を果たしたものと推定されることから、児童や園児が麻疹を疑われると診断された場合や医師から通学許可が出る前には登校の禁止等の予防対策の徹底が重要と考えられる。

定点医療機関の調査では、予防接種対象前の12ヶ月未満の幼児が17名で全体の約19%にのぼっているが、感染症発生動向調査による同期間における石巻管内の患者発生データでも12ヶ月未満児が24名(約17%)を占めているなど、今回の定点医療機関による調査が石巻地域の患者発生状況をほぼ把握しているものといえる。これらの調査結果から、1才から7才6ヶ月の幼児を予防接種対象者とするわが国の予防接種法の対象年齢の再検討が必要ではないかと思われる。

また、今回の調査で罹患者の96%が予防接種未接種であったが、これは厚生労働省による罹患者の95%以上が予防接種未接種との全国調査結果<sup>3)</sup>とほぼ一致している。本研究の予防接種率については、過去2年間の未接種者

数を当該年の対象者数に繰り入れて算出したが、今回の調査で未接種の2才児が13名(14%)も発症していることを考えれば、1才の人口のみを予防接種対象者としている現在の一般的な予防接種率の算定法の再検討が必要と思われる。また、予防接種をしているにもかかわらず11才及び12才の2名の患者がみられたことから、ワクチンによる抗体の持続性についても詳しい調査を実施する必要性を感じた。

また今回の石巻地域での流行については、2000年の初旬に栗原管内で小規模の流行が起り、麻疹ウイルスが登米管内を經由して石巻管内へ持ち込まれた可能性も考えられるが、2000年から2001年にかけて全国的に麻疹が流行しており、それらの流行地域からの人の移動等で多方面から石巻地域に麻疹ウイルスが持ち込まれた可能性も否定できないものと考えられる。

## 謝 辞

今回の麻疹患者の調査に当たっては、ご協力いただいた社団法人宮城県医師会及び北川小児科医院、おおば小児科医院、中山こどもクリニック、阿部こどもクリニック、田中こどもクリニック、堺小児科医院並びに本県保健福祉部健康対策課に深謝いたします。

## 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、同省大臣官房統計情報部：感染症週報、Vol. 3 (15)、4、(2001)
- 2) 財団法人日本公衆衛生協会：感染症予防必携、313 (1999)
- 3) 国立感染症研究所、厚生労働省健康局結核感染症課、同省大臣官房統計情報部：感染症週報、Vol. 3 (28)、14、(2001)

# エクセルを利用した簡易GISによる環境情報の活用

## Practical Use of Environmental Information with Simple GIS on MS-EXCEL

高橋 正人\* 小室 健一 渡辺 丈夫

Masato TAKAHASHI, Ken-ichi KOMURO, Takco WATANABE

キーワード：環境情報 地理情報システム

Key Words : Environmental Information, GIS

近年、地理情報システム（GIS）の普及はめざましく、環境分野においても様々な形で活用されつつあるが、システム導入には多額の費用が必要であり、行政における導入対象は、重要性が高く、かつ投資効果が明らかである業務に限定される。国土地理院発行の数値地図を表計算ソフト上で描画することで、専門のGISソフトを使用しない簡易GISの構築を試みた。

### 1 はじめに

#### 1.1 GISの発展・普及と行政での活用

GISと略称される地理情報システム（Geographic Information System）は、地理的位置の情報とその属性情報をあわせて管理することのできるコンピュータシステムであり、

- ① 表示画面の自由な拡大・縮小
- ② 条件合致データの抽出
- ③ 演算
- ④ 空間解析（バッファリング、ネットワーク分析）

など、従来の地図やシステムがなしえなかった機能を実現するもので、GISが持つ特有の機能により

- ① 従来算出が不可能または困難であった数量の算出と把握
- ② 作成可能な図表の多様化と労力の軽減
- ③ 判断材料の増加による意志決定の支援

といったことが実現可能となる。

90年代初頭まではワークステーションベースのものが大学、研究所に限って使用されていたにすぎなかった。これは地理情報と属性情報を同時に操作するのが当時のPCの能力を超えていたこと、需要が限られていたため高価格であったこと、英語版が主であった上、操作性が特殊なものであったことなどの事情によるものであった。しかしWindows95登場以降の低価格化・高性能化によるPCの一般化と相まって、ソフトの低価格化・多様化により、GISの普及が年々進んでいる状況にある。行政においては当初、道路網や複雑な管網を管理する必要のある土木部局において早期に導入が進んだが、現在では多く

\* 現 環境対策課

の部局で既に導入済または計画中であり、地理に関係したシステムの設計時には、GISをベースすることが一般化しつつある。

GISを導入することで業務内容のレベルアップを図ることは、図面を頻繁に使用するなど地理的位置が大きい意味を持つ業務、あるいは地理に関係した解析が必要となる業務において前向きに検討されるべき事項である。環境行政においても環境情報の処理や解析、評価という目的においては、市町村単位からピンポイント的なものまで地理情報に関係したデータを多く含むため、GISの有用性は非常に高いといえる。

行政分野における導入意義としてはGISが共通して有する

- ① 簡易な解析
- ② 多様な資料作成

といった機能を活用して

- ① 行政内部の現状把握能力の向上
- ② 施策検討時の意思決定支援
- ③ 県民等行政部外とのコミュニケーション能力向上
- ④ データ提供・管理機能充実

といった成果が期待される。

保健環境センター情報管理部においては、特に環境情報の活用という点で、環境基本計画進行管理のため、計画で使用される指標値及びその原データ、大気水質測定値、基本的な社会指標値等を収録した総合的なGISシステムを計画・構築中である。これによって従来の1kmメッシュ管理から緯度経度レベルでの管理形態へ進化し、その成果はさらに環境白書への掲載図表の拡大やWebサイトを使用しての環境情報提供へと発展することが可能で

ある。

GISの利用は今後さらに成熟し、将来においては官民を問わず、あらゆる業務で使用されるようになっていくものと想像される。

### 1.2 GISの問題点

このように極めて高い能力と可能性を有するGISではあるが、導入にあたり注意すべき点もいくつか挙げられる。まず、システムの構築には、専用のGISソフトが必要となる。現在では日本語版の優れたソフトも多く販売されているが、その使い勝手はそれぞれのソフトに固有のものであり、習熟に相当期間を必要とする。また地理情報を扱う上では地理学に精通することも要求される。また、ソフト・ハードとも価格は低下しているものの、基本機能だけでは実現できない機能を盛り込むため、あるいはユーザーインターフェース向上のため、場合によってはデータ処理の段階から業者委託によるシステム整備を行うことが不可欠になっており、その費用は数百万から数千万円に及ぶ。また、システム構築時に見落とされがちであるが、システムの機能追加や変更が必要となる際も同様に委託の必要が生じ、内容に応じて数十万から数千万円の費用が生じるのが普通である。

単に人手ではまかないきれない高度な処理を行うシステムはその効果に応じて複雑なものとなることは避けられず、予算措置とシステム運用体制が完備して初めて有効なものとなる点には留意すべきである。

### 1.3 エクセルと数値地図を活用した地理情報システム

マイクロソフトエクセルはワープロと並び各種業務における汎用ソフトとして使われているが、その機能はもはや表計算ソフトという呼称だけで言い表されるものではなく、グラフ作成機能等グラフィックの充実、フィルタ・集計等データベース機能の活用によるデータ管理能力、標準で添付される言語によるプログラミングまでの発展性等、豊富な機能と分かりやすいインターフェースに加え、きわめて高い可能性を包含するものといえる。

汎用ソフトを利用したGISは専門的なGISと補完的に使用でき、高度な機能を必要としない分野においては相当の効果を上げることができると期待される。ここではエクセルの数多い機能の中でも比較的使用頻度の高い図形描画機能を使用して、簡易的なGISを構築することを試みた。

## 2 方法と結果

### 2.1 数値地図のポリゴン（多角形）化

国土地理院発行の数値地図はベクトル化された地図情報を収録したもので、標準2次メッシュ内の座標を1から10,000まで整数値で表した約1m単位のデータである。行政界を表すラインデータは、行政界のレベル、両側市町村に関する情報を含んで、1レコードに座標データが最大7組収録されたテキストデータである。

ここでは各市町村毎にポリゴン化を行い、市町村デー

タの色分け表示機能を構築することを試みた。

数値地図は、ある市町村が4つのラインで構成されている場合、図1に表す通りラインの出現順序は任意である上、始点終点の規則もないため、各市町村を単一のポリゴンとして描画するには次の手順をとる必要がある。

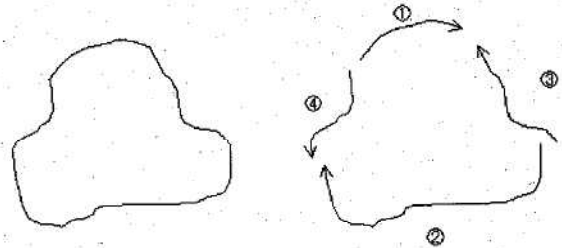


図1 数値地図におけるラインの構成

- ① 数から数十レコードに細分された各ラインをそれぞれ1ライン1レコードに統合する。
- ② 複数市町村にまたがる境界線をそれぞれの市町村に振り分ける。
- ③ 対象市町村のデータを抽出し、右（あるいは左）周りに一筆書きができるよう座標データを揃える。
- ④ 整ったデータにしたがって、プログラム言語を用いて描画する。

描画プログラムの一部を以下に示す。

ActiveSheet.Shapes(s).Select...①

Selection.ShapeRange.Nodes.Insert n,msoSegmentCurve,msoEditingAuto,x(i-1)+0.05,y(i-1)+0.05...②

Selection.ShapeRange.Nodes.SetPosition n+1,x(i),y(i)...③

[説明]

- ① ポリゴン化途中の線を選択する。
- ② 直前に描画した端点nを延ばす。
- ③ 延ばした先を端点n+1とし、座標x(i), y(i)に位置づける。



図2 ポリゴンによって描画した県域図

この方法により宮城県を描画したものが図2である。各市町村は描画順にシーケンシャルナンバーが付き、例えば10番目の市町村はshapes(10)として認識される。

2.2 エクセル上での活用例

図3は近年の国勢調査データに基づいた各市町村データをエクセル上に入力したものである。

No	コード	市町村名	1,980	1,985	1,990	1,995
1	101	仙台市青葉区			259,998	270,515
2	102	仙台市宮城野区			172,718	176,627
3	103	仙台市若林区			129,436	128,942
4	104	仙台市太白区			199,890	212,412
5	105	仙台市泉区			156,356	182,601
6	202	石巻市	120,699	122,674	121,876	121,209
7	203	塩竈市	61,040	61,825	62,025	63,566
8	204	古川市	57,080	60,718	64,230	69,180
9	205	気仙沼市	68,551	68,137	65,578	62,999
10	206	白石市	41,275	42,262	42,030	41,852
11	207	名取市	49,715	50,897	53,732	61,893
12	208	角田市	33,731	35,119	35,431	35,316
13	209	多賀城市	50,785	54,436	58,456	60,625
14	211	岩沼市	34,910	36,519	38,081	40,072
15	301	蔵王町	13,833	14,175	14,074	13,915
16	302	七ヶ宿町	2,926	2,543	2,208	2,174

図3 国勢調査に基づく人口データ

このデータを使用して人口の変動に応じて描画を行ってみる。プログラムの一部を示す(人口増の市町村をピックアップする場合)。

```

sr = Cells(83, 7) * 100
sr = (100 + sr) / 100
For a = 1 To 75
    If Cells(a + 1, 4) > 0 Then
        If Cells(a + 1, 7) / Cells(a + 1, 4) >= sr Then
            ActiveSheet.Shapes(a).Select
            Selection.ShapeRange.Fill.ForeColor.SchemeColor = 29
            Selection.ShapeRange.Fill.Visible = msoTrue
            Selection.ShapeRange.Fill.Solid
        End If
    End If
Next a

```

[説明]

- ① 何パーセント増を対象にするか境界値を設定
- ② 割合に変換する
- ③ 1から75までの市町村について、人口増加率が境界値以上なら色分けする

10%増とした場合の描画結果を図4に示す。

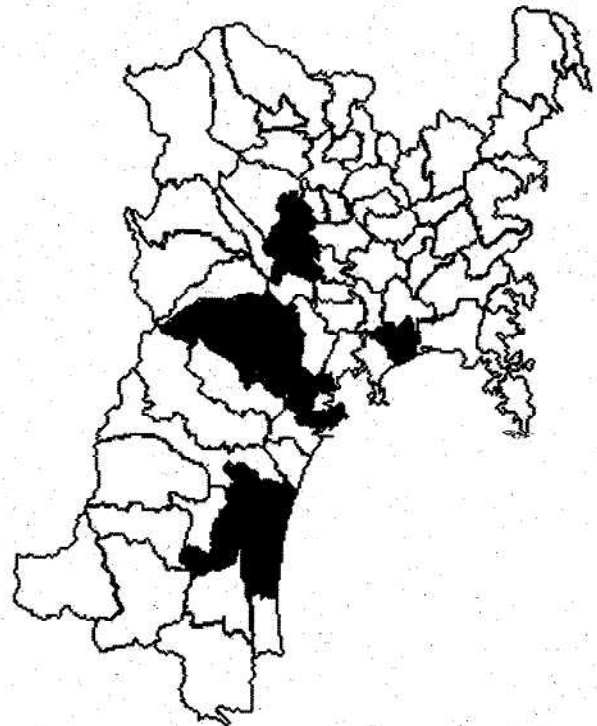


図4 人口の伸び率によって色分けた県域図

3 まとめ

専用のGISソフトが普及し、業務遂行上大きな力となるのは好ましいことであるが、他方で簡便かつ安価なGISが検討されてもよいと考える。表計算ソフトとして広く普及しているエクセルは会計やグラフ作成機能のみならず、多様な機能を有しており、エクセルの図形描画機能と基本的なデータベース機能を活用して、比較的平易なプログラムでも相当なレベルの業務支援が可能であると思われる。

GISの普及は省庁レベルでも重点事項とされており、以前は有償で販売していた国土数値情報などもWebサイト上で無償ダウンロードが可能になっている。環境情報処理という点では、例えば河川流路のデータに水質情報を色分け表示したり、緯度経度情報から調査地点をプロットするなどの作業も簡易にできるものと思われ、地理情報の簡便な利用が一般的に普及することが期待できる。



# 食品中で産生される黄色ブドウ球菌毒素とセレウス菌の耐熱性嘔吐毒素の検出

## Detection of Heat-stable Emetic toxins Produced by *St.aureus* and *B.cereus* in Foods.

畠山 敬 山口 友美 佐々木 美江  
齋藤 紀行 白石 廣行

Takashi HATAKEYAMA, Yumi YAMAGUCHI, Mie SASAKI  
Noriyuki SAITO, Hiroyuki SHIRAISHI

キーワード：耐熱性，嘔吐毒素，黄色ブドウ球菌，セレウス菌，Hep-2細胞

Key Words: Heat-stable, Emetic toxin, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, Hep-2 cell

ブドウ球菌の産生する催吐性を持つエンテロトキシン及びセレウス菌の嘔吐毒素は耐熱性で，加熱調理等により原因菌が死滅しても毒素は破壊されない。更に，両菌とも環境に広く常在する菌であることから菌の分離だけで食中毒原因と推定するのは困難であり，原因特定のためには食品からの毒素の検出が必要とされる。そこで，実際の食中毒事例から分離した菌株を用い，添加培養した食品中に産生される毒素の濃縮方法を検討した。また，セレウス菌毒素はHep-2細胞によるバイオアッセイでの検出を試みた。

### 1 はじめに

昨年，関西圏で乳製品に起因する大規模な食中毒事件が発生した。原因は黄色ブドウ球菌の産生する催吐性を持つエンテロトキシンと特定されたが，食品から菌を分離することはできなかった。一方，当県でも昨年，セレウス菌を原因とする食中毒事件が発生したが，下痢の原因となるセレウス菌エンテロトキシンは検出されず，セレウス菌嘔吐毒素の関与が示唆された。

ブドウ球菌及びセレウス菌はともに環境常在菌であり，同一食中毒事件で両菌株が同時に分離されることが希ではない。従って，菌の分離だけで食中毒原因と推定するのは困難で，原因特定には食品からの毒素の検出が必要となる。そこで今回，1. 食中毒事例から分離された菌株を食品に添加培養し毒素の検出限界を調べること，2. 食品から毒素の濃縮を試み，毒素検出方法を検討することを目的として実験を行ったので報告する。

### 2 材料と方法

#### 2.1 材料

菌株は過去の食中毒事例で分離したエンテロトキシンA産生型黄色ブドウ球菌（以下，ブドウ球菌）及び嘔吐型食中毒事例より分離した嘔吐毒素産生型セレウス菌（以下，セレウス菌）を使用した。

#### 2.2 実験方法

各菌株を初期濃度 $10^3$ 個/ml(g)で増菌培地（ブドウ球菌はHIブイオン，セレウス菌はTSB）または市販のチャー

ハンに添加培養し，各種温度で経時的に菌数と毒素濃度の測定を行った。

#### 2.3 毒素の検出方法

ブドウ球菌エンテロトキシン（以下，ブドウ球菌毒素）は「デンカ生研」社製の凝集反応キット（検出感度1ng/ml）を用いた。セレウス菌嘔吐毒素（以下，セレウス菌毒素）は市販の測定キットがないため，Hep-2細胞とホルマザン色素形成試験の組み合わせによるバイオアッセイ系を使用して毒素を検出した。セレウス菌の培養上清を121℃で15分加熱後に10,000rpm 5分間遠心分離した検体10 $\mu$ lと $5 \times 10^5$ 個/mlに調製したHep-2細胞200 $\mu$ lとを96ウエルのフラットプレートで混合培養した。37℃の炭酸ガス孵卵器で40時間培養後，培養液を5mg/mlにMTT（dimethylthiazolyl diphenyltetrazolium bromide）試薬を含む維持培地100 $\mu$ lに交換し3時間培養を続けた。培養後プレートを生理食塩水で3回洗浄し100 $\mu$ lのDMSOでホルマザン色素を溶出し490nmの吸光波長で測定した。ブドウ球菌毒素濃度は，ラテックス凝集力価から換算し，セレウス菌毒素活性はコントロールとして用いたHep-2細胞代謝に対する阻害活性（以下，毒素活性）として%で表示した。

#### 2.4 毒素の濃縮

食品から直接毒素検出のできなかった検体，あるいは検出限界にある検体を使用して，毒素を濃縮しその効率を比較検討した。

ブドウ球菌毒素は水系溶媒に可溶なため，食品からの

抽出は緩衝液と精製水を使用した。

イオン交換法は食品抽出上清を脱塩し0.05M Tris塩酸緩衝液 (pH7.5) に置換したものをQ-Sepharoseで濃縮し, hydroxyapatite法では0.01Mリン酸カリウム緩衝液 (pH6.8) に置換したものを使用した。また, 透析濃縮法は透析膜 (分画分子量1万) を使用し逆浸透によって濃縮を行った。

一方, セレウス菌毒素は疎水性が強く, 有機溶媒可溶性であることから, 逆相分配を利用しSep-pak C-18カラムに10%メタノールで吸着させ100%で溶出する方法とエーテルによる有機溶媒抽出を試み, 乾固後アセトンに溶解した検体の毒素活性を測定した。

### 3 結 果

#### 3.1 増菌培地での各菌の毒素産生性と増殖性

増菌培地を用いた実験では15℃培養ではいずれの菌も毒素を産生しなかった。25℃培養ではブドウ球菌で12時間目から, セレウス菌では24時間目から毒素が検出されたが, 両菌株を37℃で培養した場合にはブドウ球菌で8時間, セレウス菌では12時間から毒素が検出された (図1)。

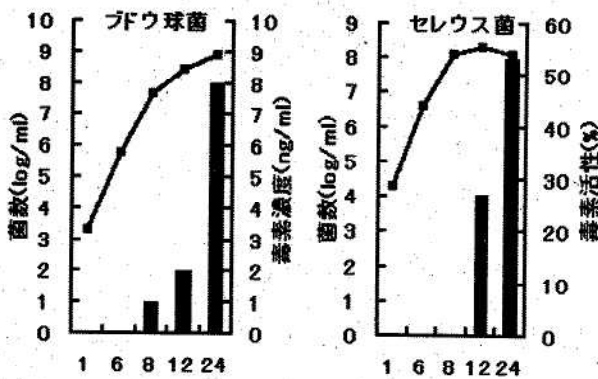


図1 増菌培地での菌の増殖と毒素産生性(37℃)

毒素が検出された時間でのそれぞれの菌数はブドウ球菌で $10^7$ 個/ml以上, セレウス菌では $10^8$ 個/ml以上であった。さらに45℃での培養ではブドウ球菌は37℃で培養した場合と同様に毒素が検出されたが, 24時間目での毒素量が37℃培養の場合より低下していた。また, セレウス菌培養上清からは, この温度ではほとんど毒素を検出することができなかった (図2)。

#### 3.2 食品中での毒素産生性

前述の結果から, 両菌株とも37℃を毒素産生の条件として実験を行った。

ブドウ球菌では増菌培養の場合と同様に培養8時間目毒素が確認されたが, セレウス菌の場合, 毒素が検出された時間は増菌培地で行った場合に比べて遅く, 毒素の産生が確認されたのは培養18時間目であった (図3)。

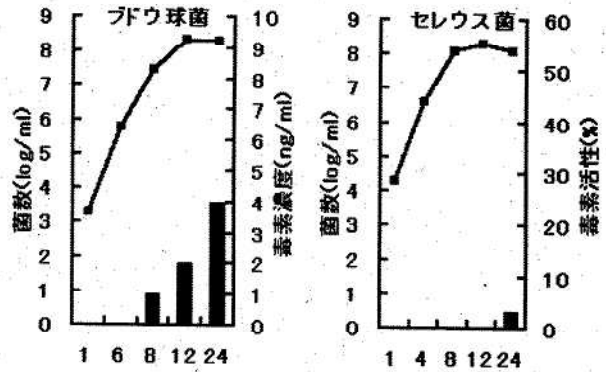


図2 増菌培地での菌の増殖と毒素産生性 (45℃)

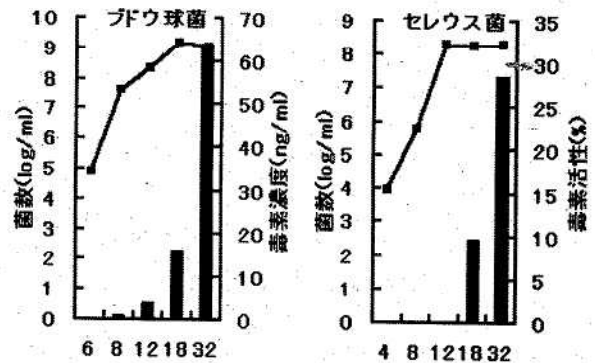


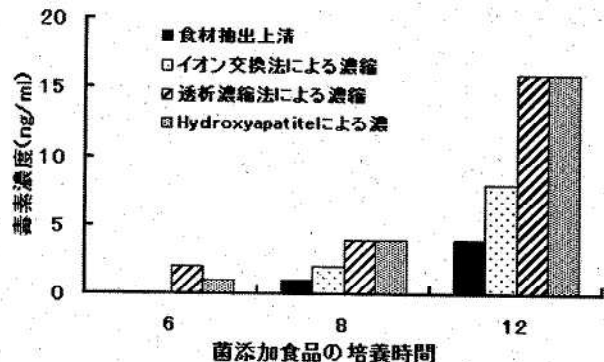
図3 食品中での菌の増殖と毒素産生性 (37℃)

#### 3.3 食品中の嘔吐毒素の濃縮方法

ブドウ球菌毒素は菌添加培養後6, 8, 12時間目の3検体 (等量の緩衝液で抽出した後の検体中の毒素濃度 $<1$  ng/ml,  $1$  ng/ml,  $4$  ng/ml) を使用して濃縮実験を行った。

濃縮後の液量から換算した場合, イオン交換法では最終的な毒素回収率が20%であったのに対し, 透析濃縮法は回収率80%, hydroxyapatite法は40%であった (図4)。

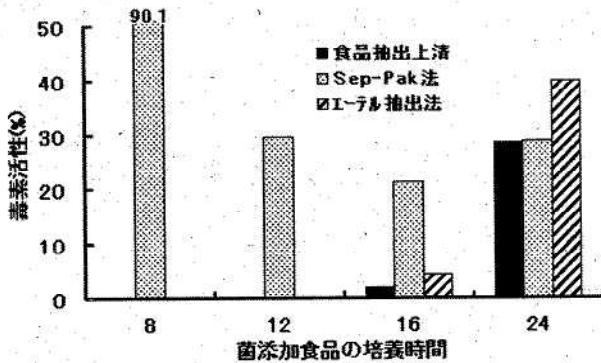
図4 ブドウ球菌毒素濃縮方法の検討



また, セレウス菌では, 毒素が確認されなかった培養後8, 12時間目と確認された16, 24時間目の4検体 (毒素活性0%, 0%, 2.2%, 28.7%) までの4検体を使用して検討した。Sep-pakによる濃縮では, 培養初期の段階で現れた細胞に対する強い非特異反応の影響により毒素活性を判定することができなかったが, エーテル抽出法

は培養16時間目に毒素活性4.5%，24時間では40%と、未処理の食品抽出上清に比べ活性が上昇した（図5）。

図5 セレウス菌毒素濃縮方法の検討



#### 4 考 察

ブドウ球菌エンテロトキシン及びセレウス菌の産性する嘔吐毒素は耐熱性で100℃以上の高温に長時間安定なため、通常の調理工程では原因菌が死滅しても毒素は破壊されない。

関西で起きた食中毒事件の場合、加熱調理後も毒素活性が残存したことがその発生の理由であった。毒素型食中毒事件の場合、原因菌だけではなく原因食品からの毒素検出が重要で、それをどのような手段で濃縮し、どのような方法でアッセイするかが問題である。ブドウ球菌毒素は市販のキットにより検出可能であるが、セレウス菌毒素は低分子のペプチドのため化学分析に頼らざるをえず抗体等を使用した簡単な測定法は未だに開発されていない。

そこで今回、我々は最近報告された文献から培養細胞系とホルマザン色素形成試験を組み合わせた方法でセレウス菌嘔吐毒素の検出を試み、これらを利用して食品中のブドウ球菌毒素及びセレウス菌毒素の濃縮検出方法について検討した。

結果として、ブドウ球菌毒素は濃縮操作を加えることにより検出限界以下の毒素を含む食品からの検出が可能であった。回収率は透析濃縮法が優れていたが濃縮に時間がかかることから、操作が簡便で比較的回収率も高く、処理時間が短いhydroxyapatiteによるバッチ法を同時に行うのが有効であると考えられた。また、セレウス菌毒素はSep-Pakを用いた濃縮法では培養の初期段階の検体でHep-2細胞に非特異的な毒性反応が起こり毒素の正確な検出が不可能であった。一方、エーテル抽出ではこれらの反応が起こらず、食品上清で試験を行った場合と同様、培養時間に伴い毒素活性が上昇し検出感度も良好であった。

#### 5 ま と め

- (1) ブドウ球菌毒素は食品抽出上清に濃縮操作を加えることで検出限界以下の毒素が検出可能である。
- (2) 毒素の回収率は透析濃縮法が勝るが、hydroxyapatiteによる処理も迅速性に優れる。
- (3) セレウス菌毒素はSep-Pak法では培養初期に非特異的細胞毒性が観察され、毒素の濃縮・検出に適さない。
- (4) エーテル抽出法は食品抽出上清と同様の試験結果を示し、検出感度も良好である。

#### 参 考 文 献

1. Finlay WJ. et al.: Semiautomated metabolic staining assay for *Bacillus cereus* emetic toxin., *Appl Environ Microbiol.* Apr; 65(4): 1811-2, (1999)
2. 安形則雄 太田美智男 *Bacillus cereus*の食中毒毒素. *日本細菌学雑誌* 51(4): 993-1002, (1996)
3. 公衛研ニュース 大阪府立公衆衛生研究所No.12: 1-2, (2000)
4. 坂崎利一編 食水系感染症と細菌性食中毒. 中央法規出版 (1991)

## セレウス菌のパルスフィールドゲル電気泳動による解析

Analysis of *Bacillus cereus* by Pulsed-field Gel Electrophoresis

山口 友美 野池 道子\*1 佐々木 美江  
畠山 敬 齋藤 紀行 白石 廣行  
後藤 つね子 日野 久美子 氏家 雪乃  
小林 妙子

Yumi YAMAGUCHI, Michiko NOIKE, Mie SASAKI  
Takashi HATAKEYAMA, Noriyuki SAITO, Hiroyuki SHIRAIISHI  
Tsuneko GOTO, Kumiko HINO, Yukino UJIE  
Taeko KOBAYASHI

キーワード：セレウス菌，パルスフィールドゲル電気泳動，  
エンテロトキシン，嘔吐毒素

Key Words : *Bacillus cereus* , PFGE, Enterotoxin, Emetic Toxin

セレウス菌を食中毒原因菌と判断するには、原因食品や患者材料などから分離された菌株が毒素を産生すること、および同一血清型菌であることが重要となるが、市販の抗血清がないため菌株を型別することは困難である。

そこで、パルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) 法を用いたセレウス菌の分類・識別方法を検討した結果、制限酵素 *Sma* I および *Not* I を併用することにより型別が可能であることが明らかになった。

## 1 はじめに

セレウス菌は自然界に広く分布するグラム陽性好気性有芽胞菌で、食品の腐敗、変敗等を起こすことが知られている食中毒原因菌である。セレウス菌による食中毒は、「嘔吐型」と「下痢型」の2種類に大別され、嘔吐毒素が関与する「嘔吐型」は吐気、嘔吐を主症状とし、潜伏期間は1～5時間と短く、原因食品のほとんどは米飯類やめん類といわれている。一方、エンテロトキシンが関与する「下痢型」は下痢、腹痛を主症状とし、潜伏期間8～16時間で発症する。近年は「下痢型」食中毒の発生頻度は少なく、「嘔吐型」食中毒が多くを占めている<sup>1)</sup>。

食中毒原因菌の検索において、セレウス菌は食品や健康者便からも高率に検出されるため、分離された菌のエンテロトキシンや嘔吐毒素産生の有無、血清型別などの検査が重要となる。しかし、嘔吐毒素を検査するには、動物や培養細胞を用いる方法が研究されてはいるが簡易で実用的な検査法は開発されていない。また、抗血清も市販されていないためにセレウス菌を型別することは困難である。

そこで、パルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) 法を中心にセレウス菌の遺伝子解析を行い、DNAのPFGEパターンによる菌株の型別方法を検討し、さらに血清型や

毒素型との関係についても調査したので報告する。

## 2 材料および方法

材料には昭和63年から平成12年9月までに発生した食中毒事件で、検査依頼のあった検体より分離されたセレウス菌69株と市販食品および拭き取り検体より分離された12株の計81株を用いた。

血清型の決定は東北食中毒研究会より分与された抗H血清1～23型<sup>2)</sup>を用い、エンテロトキシンの検出にはデンカ生研社のRPLAキットを用いた。また、嘔吐毒素試験はFinlayら<sup>3)</sup>が報告したHep-2細胞を用いたバイオアッセイにより行った。

PFGE法は定法<sup>4)</sup>に従い、リゾチーム/リゾスタフィン処理で溶菌した後、4種類の制限酵素 *Sma* I, *Sfi* I, *Xba* I および *Not* I でDNAを切断してBIO-RAD社製のCHEF Mapperで20時間電気泳動を行った。

## 3 結果

### 3.1 H血清型と毒素型

今回用いた菌株のH血清型と毒素産生の有無を表1に示した。81株中、嘔吐毒素試験陽性は12株、エンテロトキシン陽性が57株、両毒素とも陰性は12株であった。血清型は54株について行ったが、エンテロトキシン陽性株

\*1 現 仙南・仙塩広域水道事務所

ではH11と15の混合型(4株), H23(4株), H4(2株), H13(2株)など様々な血清型が見られ, 型別不能株も24株(44%)と約半数を占めた。これに対し, 嘔吐毒素試験陽性株は12株すべてがH1と17または18の混合血清型であった。

表1 H血清型と毒素型

H血清型	嘔吐毒素	エンテロトキシン	陰性
1, 17	1	0	0
1, 18	11	0	8
4	0	2	0
11, 15	0	4	0
13	0	2	0
17	0	1	0
20	0	1	0
23	0	4	0
型別不能	0	24	0
NT	0	19	4
計	12	57	12

NT: 検査未実施

### 3.2 各種制限酵素によるPFGEパターン

4種類の制限酵素(*Sfi* I, *Xba* I, *Sma* I, *Not* I)を用いてPFGE法による型別を試みた。

*Sfi* I, *Xba* Iの結果は図には示していないが, *Sfi* I処理ではバンドが4~5本しか観察されず, *Xba* I処理では100Kbp以下に20~30本のバンドが集中する結果となり, *Sfi* I, *Xba* Iとも解析には不適であった。

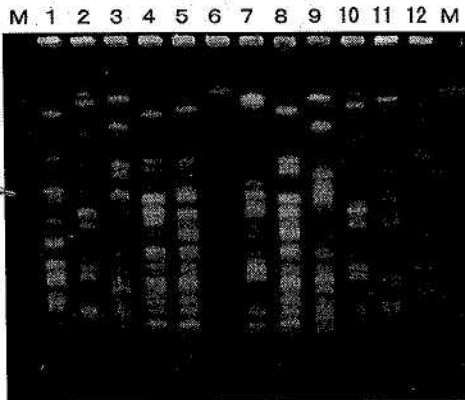


図1 食品・ふきとり由来株の*Sma* Iパターン

*Sma* I処理では多くの株で400Kbp以下に20~30本のバンドが観察された。市販食品および拭き取り検体より分離された12株を*Sma* I処理したPFGEパターンを図1に示した。PFGEパターンは様々なものが見られたが, レーン6のようにバンドが1~2本しか観察できず, PFGE解析が不能であるものも8株ほど認められた。

同じ検体を*Not* Iで処理したPFGEパターンを図2に示

した。*Not* I処理では, 400Kbp以下に10~15本のバンドが観察された。レーン6は*Sma* Iではバンドが1本しか観察されなかったが, *Not* Iでは解析可能となった。逆に, レーン11は*Sma* Iでは解析可能であったが, *Not* Iでは解析不能となった。

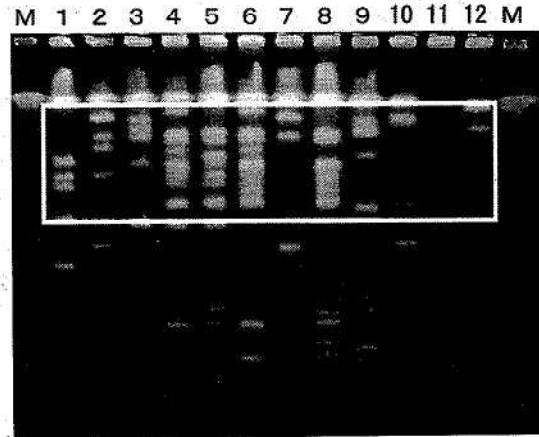


図2 食品ふきとり由来株の*Not* Iパターン

### 3.3 *Not* Iパターンにおけるバンド数と毒素型

図2のレーン3, 7, 9, 11はエンテロトキシン陽性株, レーン4, 5, 6, 8は嘔吐毒素試験陽性株である。これら嘔吐毒素陽性株のパターンに注目してみると, 嘔吐毒素陰性の株と比較し, バンド数が多いこと, 特に200~350Kbp付近のバンド数に差があることが明らかである。そこで次に, このバンド数の違いについて81株すべてを毒素型別に図3に示した。

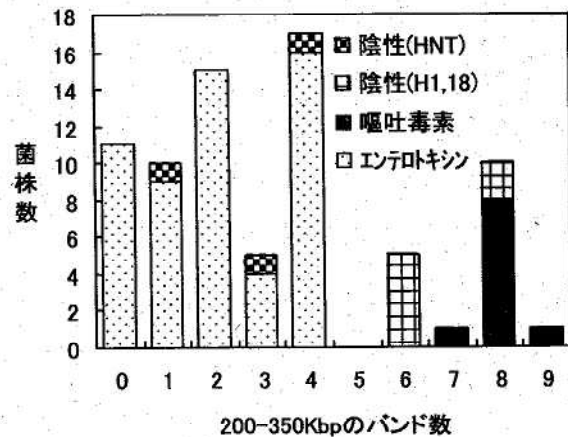


図3 *Not* IによるPFGEパターンのバンド数

エンテロトキシン陽性株は200~350Kbp付近のバンド数が55株すべて4本以下であったが, 嘔吐毒素陽性株は12株すべてが7本以上であった。また, 両毒素とも陰性の株では6本以上のものが8株あったが, それらはすべて血清型がH1, 18であった。

### 3.4 食中毒事例におけるセレウス菌型別

平成12年9月, 嘔吐などの症状を呈して父と子の家族

2人が発症し、原因食品としてチャーハンが疑われる食中毒が発生した。チャーハン、患者便2件・吐物1件、拭き取り7件の計11件からセレウス菌が検出され、すべてエンテロトキシン陰性で血清型はH1, 18であった。

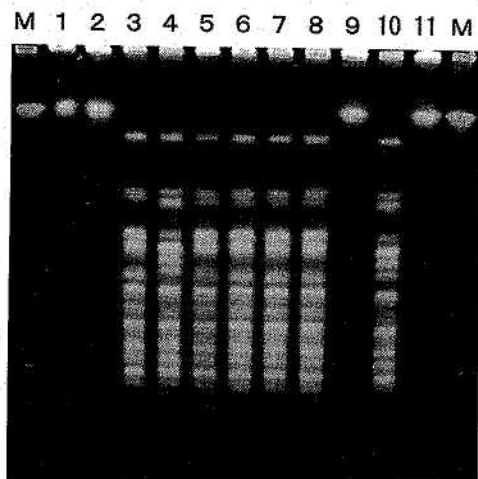


図4 食中毒事例由来株の*Sma* Iパターン

この11株についてPFGE解析を行った。*Sma* I処理によるPFGEパターンを図4に示した。レーン1, 2, 9, 11(タイプA)はバンドが2本しか観察されず解析不能であったが、他の7株については、レーン3, 5, 6, 7, 8(タイプB)とレーン4, 10(タイプC)の2タイプに分類された。

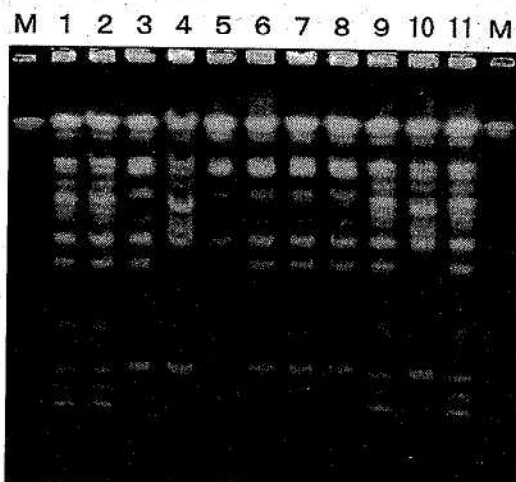


図5 食中毒事例由来株の*Not* Iパターン

同じ株を*Not* I処理したPFGEパターンを図5に示した。*Sma* Iで解析不能だったタイプAも*Not* Iでは解析可能となり、この4株が同一パターンであることがわかった。これにより、この事例で分離されたセレウス菌は血清型が同一であったがPFGEパターンによりA, B, Cの3タイプに分類され、それぞれ由来が異なると考えられた。これらの株の嘔吐毒素試験を行った結果、タイプAの4株が陽性で、それ以外の株は陰性であった(表2)。嘔

吐毒素陽性の4株には、原因食品と考えられたチャーハン、患者便および患者吐物由来の株が含まれており、これらのことからこの4株が食中毒の原因菌と推測された。

表2 毒素産生性と遺伝子解析による型別

検体名	血清型	エンテロトキシン	嘔吐毒素	PFGEパターン
1 患者便(父)	1, 18	-	+	A
2 拭き取り1	1, 18	-	+	A
3 拭き取り2	1, 18	-	-	B
4 拭き取り3	1, 18	-	-	C
5 拭き取り4	1, 18	-	-	B
6 拭き取り5	1, 18	-	-	B
7 拭き取り6	1, 18	-	-	B
8 拭き取り7	1, 18	-	-	B
9 チャーハン	1, 18	-	+	A
10 患者便(子)	1, 18	-	-	C
11 吐物(子)	1, 18	-	+	A

#### 4 考 察

セレウス菌は自然界に広く分布し、各種食品からも高率に検出される。特に豆腐での汚染率が高く、検出率が56%であったとの報告<sup>9)</sup>もある。今回、市販食品から分離したセレウス菌も9株中8株が豆腐からであり、この中にはエンテロトキシン陽性1株および嘔吐毒素試験陽性が3株認められた。このことは、食中毒の原因となりうるセレウス菌が食品中にも多数存在することを示している。

したがって、セレウス菌による食中毒と判断するには患者材料や推定原因食品から本菌が分離されるだけでなく、患者材料や食品から多数検出されること、生化学性状および血清型が一致すること、エンテロトキシンおよび嘔吐毒素の産生性を確認することなどが原因菌推定のための必須条件となる。

セレウス菌の血清型別は鞭毛抗原であるH抗原により行われる。嘔吐型食中毒事例ではH1型またはH1とその他H型の混合血清型によるものが多いといわれ、今回型別を行った株のうち嘔吐毒素試験陽性株はすべてH1と17または18の混合血清型であったという結果はそれと一致した。しかし、型別を行った菌株の約半数が判別不能であったこと、さらに抗血清が市販されていないことなどから、血清型以外の鑑別法が必要とされる。そこで、他の病原菌にも汎用されているPFGE法を試みた。

セレウス菌のPFGE解析についての報告は数が少なく<sup>6)</sup>、用いられている制限酵素も*Sma* I, *Asc* I, *Not* I, *Sfi* Iなどさまざまである。今回の解析では、いくつかの株で*Sma* IIによるPFGE解析は不能であるが*Not* Iでは解析可能である例、あるいはその逆の例が認められた。こ

の結果から *Sma* I および *Not* I の併用が有用であることが明らかになった。さらに、血清型 H1 株は *Not* I パターンで 200~350Kbp 付近にバンドが 6 本以上観察されたが、その他の血清型では 4 本以下であったことから、血清型 H1 株は *Not* I パターンのバンド数から鑑別可能と考えられた。また、セレウス菌による食中毒事例では同じ血清型の菌が複数検体から分離され同一由来株と考えられたが、PFGE による遺伝子解析および嘔吐毒素試験により 3 タイプに分類することが可能であった。このように、同一血清型でも菌株により PFGE パターンが異なることから PFGE 法は血清型よりも詳細に型別可能な方法であると考えられた。

これらのことから、セレウス菌による食中毒事件の原因究明において PFGE 法は血清型による型別よりも有用な判断材料を提供する方法と考えられた。

## 5 ま と め

- (1) セレウス菌の PFGE 解析には *Sma* I および *Not* I を併用すべきであることが明らかになった。
- (2) PFGE パターンのバンド数により、血清型 H1 である株が鑑別可能と考えられ、この中に今回の嘔吐毒素試験陽性株はすべて含まれた。
- (3) セレウス菌による食中毒事例で同一血清型の菌が複数分離され同一由来株と思われたが、PFGE パターンにより 3 タイプに分類された。
- (4) 食中毒事件において、PFGE 解析によるセレウス菌の型別は必要不可欠である。

## 参 考 文 献

- 1) 食品衛生検査指針 微生物編, 178-185 (1990)
- 2) Taylor, A.J. and Gilbert, R.J. : *Bacillus cereus* food poisoning : A provisional serotyping scheme. *J. Med. Microbiol.* 3, 543 (1975)
- 3) Finlay WJ, et. al. : Semiautomated metabolic staining assay for *Bacillus cereus* emetic toxin. *Appl. Environ. Microbiol.* 65 (4), 1811-2 (1999)
- 4) 山口友美他 : パルスフィールドゲル電気泳動法による STEC の分子疫学, 宮城県保健環境センター年報, 18, 61-64 (2000)
- 5) 楠淳他 : 市販食品における *Bacillus cereus* の汚染と分離株の性状および芽胞の耐熱性, 東京衛研年報, 28-1, 11 (1977)
- 6) Liu PY, et. al. : Use of pulsed-field gel electrophoresis to investigate a pseudo-outbreak of *Bacillus cereus* in a pediatric unit. *J. Clin. Microbiol.* 35 (6), 1533-1535 (1997)

## 腸管出血性大腸菌STX2バリエーションの遺伝子解析

RCR-RFLP Analysis of Shiga-toxin2 Producing Enterohemorrhagic-*E. coli*齋藤 紀行 佐々木 美江 山口 友美  
有田 富和 島山 敬 白石 廣行Noriyuki SAITO, Mie SASAKI, Yumi YAMAGUCHI  
Tomikazu ARITA, Takashi HATAKEYAMA, Hiroyuki SHIRAIISHI

キーワード：腸管出血性大腸菌，PCR-RFLP解析，STX2バリエーション

Key Words : Enterohemorrhagic *E. coli*, Analysis of PCR-RFLP, STX2 variant

腸管出血性大腸菌 (STEC) が産生するペロ毒素 (STX) にはSTX1とSTX2の2種類がある。両者には多くのバリエーションが知られ、特にSTX2遺伝子 (stx2) には24種類の遺伝子型亜種 (stx2バリエーション: stx2v) が報告されている。宮城県内で平成8年から平成12年の5年間に発生したSTX2 STEC感染51事例についてPCR法で遺伝子解析を実施した結果、18事例がstx2vによることが確認された。更に、PCR-RFLP解析により6事例がプロトタイプとバリエーションの2種の遺伝子を保有する特異的な菌株による感染事例であることが明らかになった。

## 1 はじめに

腸管出血性大腸菌 (Enterohemorrhagic-*Escherichia coli*: EHEC) または志賀毒素産生大腸菌 (Shigatoxin-producing *E. coli*: STEC) O157感染症による国内初死亡例が1990年に報告され<sup>1)</sup>、その後1996年に大規模集団事例が発生し、続いて全国で集団あるいは散発による発生事例が相次いでいる。STEC感染では溶血性尿毒症症候群 (HUS) の併発が臨床的に重要な問題で、HUSの患者から分離される菌株の多くはSTX2産生性STECであることから、HUSの発症にSTX2が強く関与していることが知られ<sup>2)</sup>、迅速なSTX2の確認は特に重要である。一方、STX2遺伝子にはプロトタイプ以外に24種のバリエーションが知られ<sup>3)</sup>、特に欧州ではHUSはstx2バリエーションによるケースが多いと指摘されている<sup>4)</sup>ことから患者分離菌株の遺伝子型の鑑別は感染源の疫学調査上重要である。竹田はSTX2バリエーションの遺伝子を独自に設計した5種類のプライマーによるPCR (Polymerase-chain-reaction) で5つのグループに分類している<sup>5)</sup>が、煩雑さもありより簡便な鑑別法が望まれる。

そこで、宮城県内で1998年から2000年の3年間に発生したstx2vを保有するSTEC O157のについて独自の1種類のプライマーによるPCR-RFLP (restriction fragment length polymorphism) 法<sup>6)</sup>を用いstx2とstx2vとを遺伝子学的に鑑別する方法を検討したので報告する。

## 2 材料と方法

## 2.1 供試菌株

1996年から2000年の5年間に、宮城県内で発生した125事例のSTEC散発感染事例から分離したO157, 82株 O26, 103株その他9株の合計194株を供試菌株とした。

## 2.2 PCRによる遺伝子の検出

PCRによるSTX遺伝子の検出に用いたテンプレートは、STEC菌株を95℃ 6分間の加熱処理により調整した。stx1, 2の検出にはPollardのプライマー<sup>6)</sup>、stx2vhバリエーション、stx2vpバリエーションの検出には山崎のプライマー<sup>7)</sup>、更にstx2バリエーションの検出には独自に設計したA452Fプライマー (5'-GGCACTGTCTGAAACTGCTCCTG-3')、Dif-2プライマー (5'-GGTTGACGGGAAAGAATACTGGACC-3') を用いた。表1に使用した各プライマーの名称、増幅DNAサイズおよび報告者あるいは設計者名を示した。PCRは、熱変性94℃ 1分、アニーリング55℃ 1分、伸長74℃ 1分を35サイクルの条件で実施した。PCR産物はアガロースゲルで電気泳動し、エチジウムブロマイドで染色後、UV照

表1 ペロ毒素遺伝子の検出に使用したプライマー

検出遺伝子	プライマー名(増幅の大きさ:bp)	報告者あるいは設計者
stx1	VT1a, VT1b (130)	Pollad <sup>5)</sup>
stx2, stx2v	VT2a, VT2b (146)	Pollad
stx2, stx2v	VT2c, VT2d (285)	Tyler <sup>4)</sup>
stx2v	VT2v1, VT2v2 (385)	Tyler
stx2vh	VT2vhu, VT2vhd (980)	Yamazaki <sup>6)</sup>
stx2vp1	VT2p-d, VT2p-u (686)	Yamazaki
stx2, stx2v	A542F, VT2v2 (849)	Arita, Tyler
stx2	A542F, Dif2 (512)	Arita



表2 宮城県内で検出されたSTECの血清型とベロ遺伝子型

血清型	ベロ毒素	発生事例数(年度)					計
		8	9	10	11	12	
O157	stx1	1(1)	0	0	0	0	1(1)
	stx1, stx2	3(4)	3(3)*	10(22)	1(5)	11(17)*	28(51)
	stx2	3(3)*	4(5)	3(6)	5(9)	6(7)*	21(30)
O26	stx1	4(5)	11(11)	14(23)	23(35)	14(29)	66(103)
その他	stx1	1(1)	1(1)	2(2)	3(3)	0	7(7)
	stx2	1(1)*	0	0	1(1)	0	2(2)
計		13(15)	19(20)	29(53)	33(53)	31(53)	125(194)

( ) 内数字は検出菌株数 \* : HUS発症1例を含む

射下でポロライド撮影しDNAバンドとして観察した。

2.3 PCR-RFLP

STX遺伝子のBサブユニット領域の可変部位を増幅するプライマーとしてA452F, VT2v-2を選び, STX2産生STECについて前述の条件でPCRを実施した。RFLPは, PCR生成物9 µlに緩衝液1 µl, それぞれの制限酵素(10U/µl)0.25 µlを添加し37°Cで4時間以上消化した後, 電気泳動, 染色および写真撮影を行いDNA切断パターンを観察した。制限酵素はLIFE TECHNOLOGIES社製のRsa I, Alu I, Msp I及びHae IIIを使用した。

2.4 PCR生成物のシークエンス

stx2バリエーションとstx2保有菌株についてA452F, VT2v-2プライマーでPCRを行い, PCR生成物についての全塩基配列をシークエンス(パーキンエルマー社: 310 Genetic Analyser)を使用し, ダイターミネーター法で解析した。

3 結果

3.1 宮城県内で検出されたSTECの血清型とSTX遺伝子型

平成8年度(1996年)から平成12年度(2000年)までの5年間に宮城県内で発生したSTEC感染事例数を年度別に血清型及びSTX遺伝子型別に分類し表2に示した。

表3 STEC感染事例から検出されたstx2バリエーションの内訳

事例数	保有遺伝子内	事例 (菌株)
18	stx1, stx2 5	A (EC545, 546, 547, 556, 557) B (EC549, 550, 551), C (EC601) D (EC672, 676, 677), E (EC730, 73)
	stx2 13	F (EC213, 228), G (EC401), H (EC402) I (EC489, 492, 493), J (EC6009), K (EC685) L (EC686), M (EC230) N (EC334, 336), O (EC626, 629) P (EC631), Q (EC639), R (EC724)

宮城県内では5年間に125件のSTEC感染事例が発生し, 発生件数は年々増加傾向にある。STEC O26は発生事例数が平成9年度から平成11年度はSTEC O157より大幅に増加した。しかし平成12年度には逆にO157の件数がO26の件数より3事例上回った。HUSを引き起こした感染例はSTEC O157の5事例で認められ, それらの患者から分離した菌株はいずれもSTX2遺伝子保有株であった。

3.2 STX2バリエーションの検出状況

5年間に確認されたSTX2産生STEC感染は51事例で, それらの事例から分離された菌株についてPCR法でstx2バリエーションの検索を行い, STEC O157の18事例(事例A~R: 37.5%)から分離した32菌株がstx2バリエーションと確認された。更に, 各事例をから検出されたstx2バリエーションをベロ遺伝子保有状況よりSTX1, 2両遺伝子保有あるいはSTX2遺伝子保有とに分類して表3に示した。5事例がSTX1, 2保有, 13事例がSTX2保有であった。

3.3 PCR-RFLP

18事例から分離されたstx2バリエーションと対照のstx2 STEC菌株についてA452F, VT2v2プライマーを用いてPCRを行い, 849bpのアンプリコンを4種類の制限酵素でRFLPを行った結果, 供試菌株はa, bあるいはcの3



図1 STX2遺伝子保有STECのPCR-RFLP

表4 PCR-RFLPパターンによる分類と特異プライマーによる反応性

RFLPパターン	事 例	各プライマーによるPCR反応		
		VT2a, VT2b (1)	VT2vhu, VT2vhd (2)	A452F, Dif2 (3)
a	A, B, C, D, E, F, G, H, I, J, K, L	+	+	-
b	M, N, O, P, Q, R	+	+	+
c	stx2 Prototype	+	-	+

つのいずれかのパターンに分かれ、stx2バリエーションはaかbにstx2はcに分類された。図1にstx2産生STECの12菌株を制限酵素HaeIII, MspIで実施して得られたPCR-RFLPパターンを示した。菌株EC546などのstx2バリエーションはa, EC230などはbに、プロトタイプの菌株EC555, 189はcのパターンを示した。図1から明らかなようにbはaとcを合わせたパターンを示し、それらの菌株はstx2とstx2バリエーションの両遺伝子を保有している可能性を示唆している。表4にstx2バリエーション全菌株のa, bの分類と対象としてstx2プロトタイプをcとして示した。

3.4 PCRによるstx2バリエーションの分類

PCR-RFLPでa, b, cに分類されたそれぞれのグループの菌株についてstx2バリエーションを含めた全てのstx2を検出可能なVT2aとVT2bプライマー(1), stx2のバリエーションのみを検出するVT2vhuとVT2vhdプライマー(2)及びstx2のプロトタイプのみを検出するA452FとDif2プライマー(3)のそれぞれを用いPCRを行い反応した場合を+, しない場合を-としてその結果を表4に示した。aは(1)と(2)のプライマーに反応, bは(1), (2), (3)のプライマーに反応, cは(1), (3)に反応したことから, aはSTX2バリエーション遺伝子を保有, cはSTX2のプロトタイプ遺伝子を保有,

表5 stx2 STEC感染事例のペロ毒素遺伝子型による分類

	平成8年	平成9年	平成10年	平成11年	平成12年	総計
stx1+stx2	4	3	8	3	8	26
stx2	1	1	0	3	2	7
stx1+stx2v	0	0	2	1	2	5
stx2v	1	2	1	1	2	7
stx2+stx2v	1	1	0	3	1	6
合計	7	7	11	11	15	51

更にbはstx2とstx2vの両遺伝子を保有することを示している。

3.5 stx2バリエーションのペロ毒素遺伝子検出状況

宮城県内で発生したstx2 STECによる51感染事例から分離した菌株についてstx2バリエーション保有を山崎, Tylerのプライマーを用いたPCR法で確認し, 更に有田・TylerプライマーによるPCRと制限酵素を用いたPCR-RFLP法で解析を行った。その結果をSTX遺伝子保有別に分類して表5に示した。51事例の35.3% (18事例) がstx2vを保有し, そのうち6事例 (33.3%) がプロトタイプとバリエーションの両遺伝子を保有するstx2+stx2v型であり, 5事例 (27.8%) がstx1+stx2v型, 7事例 (38.9%) がstx2v型であった。

3.6 PCR生成物の塩基配列

PCR-RFLPでa, b, cの3パターンを示したそれぞれのグループから合計13菌株を選び, A452F及びVT2v-2プライマーによるPCRを行いアンプリコンについての全塩基配列解析した。その結果, aとcグループの菌株は塩基配列が解析されたがBグループのいずれの菌株も明確な解析結果が得られなかった。図2にa及びcの菌株についての全塩基配列と竹田の論文<sup>7)</sup>から転記した。特に特徴

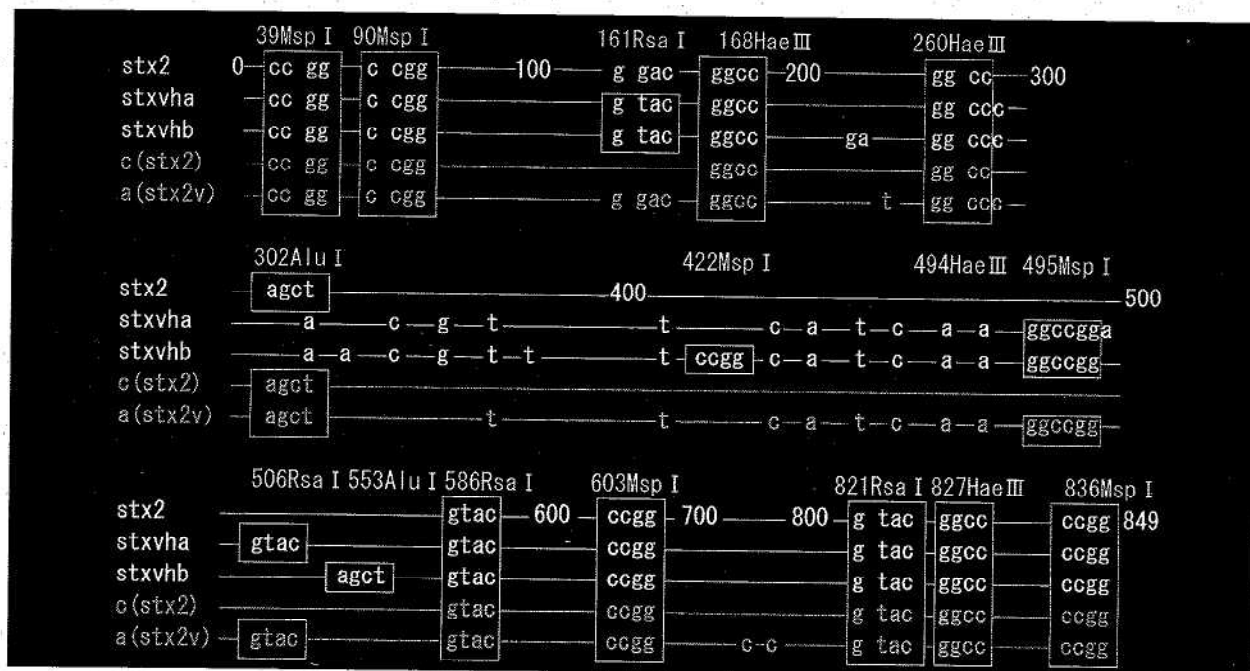


図2 A452, VT2v-2プライマーによるpcr産物の塩基配列

的な位置と各制限酵素で切断される部位だけを記号で表し同じ塩基については線で示した。この結果から、cはプロトタイプのstx2保有STECであることが確認された。またグループa分離菌株はstx2とstx2バリエーションとの塩基配列が特に異なる470-500番の領域でstx2vhaあるいはstx2vhbと配列が全く同じであるが、それ以外の分散した領域の13個の塩基が異なることから、bはstxvha、stx2vhbと異なるバリエーションであると考えられた。

#### 4 考 察

今回、宮城県において分離されるstx2産生STECは年々その割合が増えていることが明らかになった。更に、ベロ毒素遺伝子の変異種stx2バリエーションによる事例も増加傾向にある。

一方、欧州において、STEC感染症でのHUSを併発する割合はstx2保有菌株によりstx2v保有菌株が高い<sup>2)</sup>とされている。しかし、我々が経験したHUS併発5事例全てがstx2を保有し、stx2v単独の事例では発症例が認められないことから、HUSの発現にはstx2vよりstx2が強く関与する可能性のあることが示唆された。また、6事例から分離された8菌株は1菌株にstx2とstx2vの2種の遺伝子を保有していることが確認されたが、このような菌株はTylerもVT2-c、VT2-dプライマーと3種類の制限酵素を用いたPCR-RFLP法で確認し報告している。我々もVT2-c、VT2-dプライマーを用いて分離stx2バリエーションについてPCRを実施したが反応せず、確認は出来なかった。同様のことをPierardも報告している<sup>8)</sup>。そこで我々は、A452F、VT2v-2プライマーを用いたPCR-RFLPとA452F、Dif.2プライマーによるPCR法で分離菌株を分析した結果、1菌株にstx2、stx2vの存在が確認された。PCRによる通常のSTEC検査ではSTX2に共通のプライマーを使用するためこのような菌株は確認されない。しかし、今回示したPCR-RFLP法等を応用することで検出可能であると思われる。

18事例から分離されたstx2vは塩基配列の解析結果及びPCR-RFLP解析から全て同種のstx2バリエーションであったが、これは竹田が報告しているSTX2バリエーションstx2vha、stx2vhbとは異なっていた。黒川のPCR-RFLP解析によればそれらはstx2vdに分類される遺伝子型である<sup>9)</sup>と判明した。このように、宮城県内で検出されたstx2バリエーションが単一の遺伝子型だけであったことは大変興味深いところである。今後STEC感染症の予防策等を考慮する際には検出されたSTX2遺伝子についての詳細な検討も併せて実行する必要があると考えられた。

一方、近年動物-特に牛-がSTECによって汚染されている状況<sup>10,11)</sup>が明らかになり、更に動物が関与したと考えられるSTEC感染事例が多く発生している<sup>12,13)</sup>。しかも、動物から検出されるSTEC菌株の遺伝子型にはstx2vが多い<sup>8)</sup>。我々が経験した牛が感染源と考えられた3事例からはいずれからもstx2バリエーションが検出され、STEC感染に牛の関わりが強いことが改めて示された。

以上のことから、STEC感染の防止にはSTEC保有動物からヒトへの感染を遮断する方法を考慮することが重要であることが再認識させられた。

#### 参 考 文 献

- 1) 鈴木忠義：埼玉県S幼稚園における集団下痢症発生。公衆衛生情報 3：39-45, 1991
- 2) Bonnet R., B.Souweine, G.Gauthier, C.Rich, V. Livrelli, J.Sirot, B.Jolly, and C.Forestier: Non-O157: 7 Stx-2-producing *Escherichia coli* strains associated with sporadic cases of hemolytic-uremic syndrome in adults. *J Clinical Microbiology* 36: 1777-1780 (1998)
- 3) 竹田多恵：病院由来株の腸管出血性大腸菌の解析。厚生省科学研究費補助金 新興・再興感染症研究事業 総合研究報告。50-64 (2000)
- 4) Tyler, S.D., W.M.Johnson, H.Lior, G.Wang, and K.R.Rozee: Identification of verotoxin type2 variant B subunit genes in *Escherichia coli* by the Polymerase Chain Reaction and Restriction Fragment Length polymorphism analysis. 1339-1343 (1991)
- 5) Pollard DR et al.: Rapid and specific detection of verotoxin genes in *Escherichia coli* by the polymerase chain reaction., *J.Clin. Microbiol.*, 28, 540-545 (1990)
- 6) Yamazaki S.D et al.: Typing of verotoxin DNA colony hybridization with poly-and oligonucleotide probes, abeadenzymelinked immunosorbent assay, and polymerease chain reaction., *Microbiol.Immunol.*, 40, 345-352 (1996)
- 7) 竹田美文他：腸管出血性大腸菌とVero毒素。臨床と微生物, 18: 443-455 (1991)
- 8) Picard, D., G.Muyldermans, L.Moriau, D.Stevens, and S.Lauwers: Identification of New Verocytotoxin Type 2 Variant B-Subunit Genes in Human and Animal *Escherichia coli* Isolates. *J Clin Microbiolgy* 36: 3317-3322 (1998)
- 9) 黒川忠：腸管出血性大腸菌の産生する志賀毒素2型バリエーションの遺伝子型別法。公衆衛生情報みやぎ 286: 9-14 (2000)
- 10) 古田勝則, 坂田慎治, 岡本倫明 他：乳牛におけるVero毒素産生大腸菌(VTEC)の汚染状況および分離菌株の血清型。感染症学雑誌 73: 445-449 (1999)
- 11) 仁科徳啓, 神田隆：動物及び食肉における腸管出血性大腸菌分布。日食微誌。13: 199-204 (1997)
- 12) 平田清久, 田中大祐, 北村敬, 他：牧場牛舎における腸管出血性大腸菌O157:H7感染例について-富山県。病原体検出情報19, 9-10 (1998)
- 13) 齋藤紀行, 飼育牛から感染が疑われた腸管出血性大腸菌O26感染散発事例-宮城県。病原体検出情報 20, 35 (2000)

# 食品からの腸炎ビブリオO3 : K6の分離と水産加工施設の 腸炎ビブリオ汚染実態調査

Isolation of *Vibrio parahaemolyticus* O3 : K6 from Sea-food  
and the Scallop Processing Company

野池 道子\* 佐々木 美江 山口 友美  
有田 富和 畠山 敬 齋藤 紀行  
白石 廣行

Michiko NOIKE, Mie SASAKI, YUMI YAMAGUCHI  
Tomikazu ARITA, Takashi HATAKEYAMA, Noriyuki SAITO  
Hiroyuki SHIRAISHI

キーワード：腸炎ビブリオO3 : K6, 2段階増菌法, TDH, MPN値

Key Words : *Vibrio parahaemolyticus* O3 : K6, 2 step growth, TDH, MPN value

腸炎ビブリオ食中毒の原因菌の血清型はこれまでO3 : K6がほとんどを占めているが、原因食品からの検出は困難であった。そこで、平成12年に発生した食中毒事件において残された食品について従来の方法、アルカリペプトン水 (APW)・ポリミキシンブイヨン (PB) を組み合わせた2段階増菌法、更に免疫ビーズ法を組み合わせた方法でO3 : K6の分離を試みた。その結果、2段階増菌法を組み合わせた方法及び免疫ビーズ法で高率にO3 : K6が検出可能であった。一方、ホタテ加工施設における腸炎ビブリオの汚染実態調査で、加工前の殻付きホタテの中腸腺部が菌で汚染されていることが明らかになった。

## 1 はじめに

1996年以前に発生した腸炎ビブリオ食中毒事例では患者あるいは食品から検出される腸炎ビブリオ (Vp) の血清型は不特定で、更に1検体から複数の血清型の菌株が検出されることも多かった<sup>1)</sup>。1996年以降はそれまでの傾向とは様変わりし、Vp食中毒事例の患者からはO3 : K6の単独血清型の菌株が検出される事例が増加した。しかし、原因と思われる食品からのO3 : K6の検出が困難なのが現状である<sup>2)</sup>。また、海産物の流通過程での汚染実態については明らかにされていない。厚生省はVpによる食中毒の防止を目的として、昨年5月生食用水産加工品等についてのVp最確数 (MPN) の基準を提示した<sup>3)</sup>。これは海産物の流通過程での汚染実態が明らかにされていないことから水産加工品の汚染防止を求めたものである。

そこで、我々は①原因食品からのO3 : K6の検出を目的とし、県内で発生した食中毒事件での原因と考えられた食材からのTDH陽性Vpの効率的な検出を従来法と改良法とで比較検討、②海産物のVpの汚染実態と明らかにする目的で、水産加工品の流通過程のVp汚染実態調査の一環としてホタテ加工施設でのホタテについて汚染状況調査を実施したので報告する。

\* 現 仙南・仙塩広域水道事務所

## 2 材料と方法

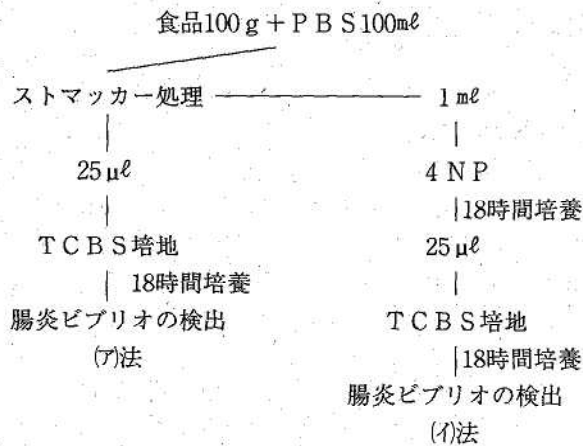
### 2.1 食材からのVpの分離

平成12年8月に発生したVp食中毒事件 (発症者6名、2名の便よりO3 : K6を検出) で感染源と考えられた食材 (①焼きイカ、②冷凍串ツブ、③冷凍串ホタテ) からVpの分離を食中毒検査手順書 (4%食塩加ペプトン水 (4NP) 使用) に従った方法<sup>4)</sup> (従来法: 直接分離法A、増菌分離法イ) とAPW・SPBを用いた2段階増菌法<sup>5)</sup>、更に2段階増菌法に免疫ビーズ法を組み合わせた方法<sup>6)</sup>の4方法で検討した。

### 2.2 ホタテ加工施設でのVp汚染状況調査

平成12年8月から9月、生食用ホタテむき身加工施設3 (A, B, C)、活ホタテ取り扱い施設1 (D) の計4施設を調査対象とした。A, B, Cの各施設からそれぞれ原貝 (殻付きホタテ) 3個、施設内処理洗浄前の貝柱 (むき身: 中腸腺部を含まず) 3個、洗浄後の貝柱3個、洗浄用滅菌海水1件、更に、D施設の蓄養前原貝3個、蓄養場流入海水1件、蓄養海水1件、蓄養後原貝3個を検査材料とした。A, B施設の原貝は当所で貝柱と中腸腺部とに分け、C, D施設においては両者を分けず摘出し、それぞれを20gを計量後、180mlのAPWを加えホモジナイズ、更にAPWで10あるいは100倍に希釈した

(1) 従来法



(2) 2段階増菌法

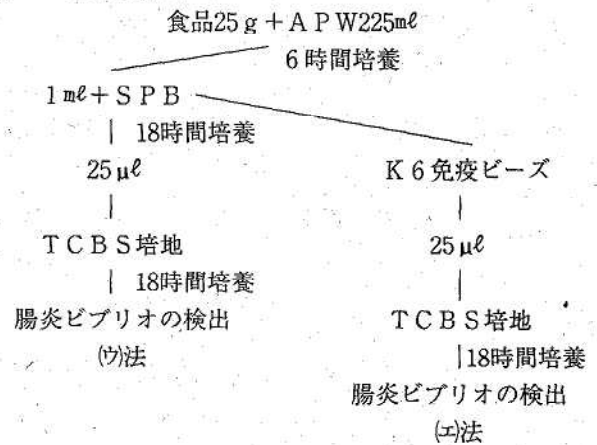


図1 食品からの腸炎ビブリオの検出法

液をMPN検出検体とした。海水の検体は培地粉末を直接加えMPN検体とした。MPN値は1日培養後、PCR法によるVp特異遺伝子toxR<sup>5)</sup>の確認とTCBSによる菌検出より算出した。

3 結 果

3.1 2段階増菌法による食中毒原因食品からのVp O3 : K6の分離

平成12年8月に宮城県内で発生したVp食中毒事件で原因施設と考えられた飲食店に残された3食品(①~③)について原因菌検索を実施した。検査は(ア)~(エ)4通りの方法を用い、図1に示した手順で実施し、結果を表1に示した。従来法の(ア)あるいは(イ)の方法ではいずれの食品からもTDH陽性のO3 : K6は検出されなかったが、2段階増菌法を用いた(ウ)の法で③から、また(エ)の方法では②③からTDH陽性のO3 : K6が検出された。

3.2 生食用ホタテのVp汚染実態調査

生食用ホタテむき身加工および活ホタテ取り扱い施設から採材した検体についてのMPN検査結果を施設、材料毎に分けて表2および3に示した。C施設では、中腸腺部を含むホタテ身のMPN値は高値を示し、MPN値が43とVpが検出された洗浄海水による洗浄では洗浄前後のMPN値に変化は認められなかった。一方、A、B施設について、原貝を貝柱と中腸腺部に分けた場合、全ての検体で中腸腺部のMPN値が貝柱より高値を示した。また、B施設の洗浄海水は完全に殺菌されていたと考えられ、

これを用いて洗浄すると洗浄後の貝柱は洗浄前よりMPN値が減少した。蓄養による効果を調査対象としたD施設において、用いた流入海水及び蓄養海水からVpが検出された。蓄養後の3検体中1検体が他と比較して僅かに低い値を示したが、蓄養前後でMPNに明確な差異が認められなかった。

表2 生食用ホタテむき身加工施設でのMPN変動

施設	原 貝		貝柱 (洗浄前・後)		
	貝柱	中腸腺部	洗浄前貝柱	洗浄水	洗浄後貝柱
A	400	1,500	7		3
	24,000	>110,000	23	20	14
	300	600	9		6
B	400	1,500	400		<3
	<3	1,600	900	<3	<3
	<3	1,100	1,500		<3
C	>11,000		>11,000		>11,000
	>11,000		>11,000	43	>11,000
	>11,000		>11,000		>11,000

表3 蓄養によるMPNの変動

施設	蓄養前原貝	流入海水	蓄養海水	蓄養後原貝
D	>11,000			>11,000
	>11,000	1,100	290	>11,000
	>11,000			4,600

表1 食品からの腸炎ビブリオの検出

食 品	方法ア	方法イ	方法ウ	方法エ
① 焼きイカ	V.p(-)	V.p(-)	V.p(+) OUT : KUT TDH(-)	N.T
② 冷凍串ツブ	V.p(+) O4 : K63 TDH(-)	V.p(+) O4 : K42 TDH(-)	V.p(+) O4 : K34 TDH(-)	V.p(+) O4 : K6 TDH(+)
③ 冷凍串ホタテ	V.p(-)	V.p(-)	V.p(+) O4 : K6 TDH(+)	V.p(+) O4 : K6 TDH(+)

#### 4 考 察

多くのVp食中毒事例において、食品からTDH陽性Vpが検出されず原因食材の特定が困難であることから、食中毒の予防対策上の大きな問題とされてきた。この問題を解決するため、我々は従来から行われている菌の検出法に着目し、菌の分離に使用される培地について検討を行ってきた。結果は示していないが、18品目の水産加工品からのVpの検出をSPBと2段階増菌法で比較検討した結果、SPB使用では全てがVp(-)であったが2段階増菌法で3品からVpを検出した。このことから2段階増菌法がVpの分離に優れていると考え、平成12年8月に発生した食中毒事件において残された3食材からのVp分離を従来法と2段階増菌法とで比較検討した。その結果、従来法ではTDH陽性のVpは検出されなかったがAPW・SPBを用いる2段階法では1食材から、また免疫ビーズ法を組み合わせるにより2食材からTDH陽性O3:K6の検出が可能であった。このように、食材からのVpの分離にはSPBあるいは4NPよりAPWが優れ<sup>6)</sup>、またO3:K6を目的とする場合には2段階増菌とビーズ法を組み合わせた方法が最適であることが明らかになった。

更に、この方法を利用して水産加工品の流通過程におけるVp汚染実態調査の一環として、ホタテ加工施設におけるホタテの汚染状況調査を行った。今回対象とした検体数は少なかったが、Vpがホタテの中腸腺に多く存在すること、完全に殺菌された海水での洗浄あるいは原貝の蓄養がVpの除去に有効である可能性が示唆された。このことから、ホタテ加工食品からのVp除菌は、ホタテの原貝を殺菌海水で蓄養し、むき身加工時は中腸腺の内容物が貝柱へ付着しないように工夫して貝柱を摘出し、更に殺菌海水で貝柱を洗浄することで可能であると考えられた。

#### 5 ま と め

食品からのVpの検出法を確立した。また、Vp食中毒の予防策として、海産物の流通過程でのVpの汚染実態を把握する目的で行った水産加工施設におけるVp汚染状況の結果から、加工過程に改良を加えることで汚染されたVpが除菌できる可能性が示唆された。

#### 6 謝 辞

検体採取及び助言を頂きました石巻保健所、塩釜保健所の食品薬事班の方々に深謝いたします。

#### 参 考 文 献

- 1) 杉山明 他：原因食品から耐熱性溶血毒産生性 *Vibrio parahaemolyticus* が検出された食中毒事例，病原微生物検出情報，Vol.20，189-192 (1999)
- 2) 食品衛生法施行規則及び食品，添加物等の規格規準の一部改正について 厚生労働省医薬局食品保健部長 通知 (2001)

腸炎ビブリオ食中毒防止対策のための水産食品に係る規格及び基準の設定について

- 3) 沖津忠行他：Vp食中毒の発生状況—神奈川県，病原微生物検出情報，20，134-165 (1999)
- 4) 食品細菌検査の手引き，宮城県保健衛生技術者発行 (1997)
- 5) Kim Y.Bu, et al: Identification of *Vibrio parahaemolyticus* strain at the species level by PCR targeted to the *toxR* gene., 37, 1173-1177 (1999)
- 6) 畠山敬他：宮城県における腸炎ビブリオ調査，宮城県保健環境センター年報，18，56-60 (2000)

# 宮城県内の温泉施設におけるレジオネラ属菌の実態調査 (第1報)

## Isolation of *Legionella* Species from Hot Springs in Miyagi Prefecture

佐々木 美江 野池 道子\* 山口 友美  
島山 敬 齋藤 紀行 白石 廣行

Mie SASAKI, Michiko NOIKE, Yumi YAMAGUCHI  
Takashi HATAKEYAMA, Noriyuki SAITO, Hiroyuki SHIRAISHI

キーワード：レジオネラ症，レジオネラ属菌，温泉水

Key Words : Legionellosis , Legionella , Hot Spring Water

県内の温泉におけるレジオネラ属菌の汚染状況を把握するため，平成12年から温泉旅館・保養施設を対象として実態調査を開始した。平成12年度は30施設の温泉水検査と浴槽周辺のふきとり検査を実施した。

その結果，温泉水101検体より28件（28%），ふきとり75検体より27件（36%）からレジオネラ属菌が検出された。検出されたレジオネラ属菌のうち96.1%が*L. pneumophila*であった。

### 1 はじめに

レジオネラ症は，レジオネラ属菌が生息している砂塵・水（エアロゾル）を吸入することによっておこる感染症である。特に，免疫力の弱い高齢者や乳幼児および基礎疾患の有する人は感染する可能性が高いことが知られている<sup>1)</sup>。

レジオネラ属菌は1976年米国のフィラデルフィア市内のホテルで開催された米国在郷軍人会の参加者を中心に発症した原因不明の集団肺炎の起因菌としてはじめて検出された<sup>2)</sup>。レジオネラ属菌種はこれまでに43菌種が患者や環境中から分離されている。レジオネラ属菌は環境中に広く生息しているだけでなく，温泉の浴槽水，空調の冷却塔水及び給湯設備等にも生息することから，日常生活において我々が感染する可能性は高く，平成12年3月には静岡県で温泉浴槽水を感染源とするレジオネラ肺炎の死亡事例が報告されるなど，早急な対策が求められている<sup>3)</sup>。

宮城県ではレジオネラ属菌生息実態調査事業として県内の温泉水におけるレジオネラ属菌の汚染状況を把握するため，保健所の協力を得て各温泉施設の実態調査を行った。今回の調査では従来の温泉水検査に加え，レジオネラ属菌が原生動物の細胞内で増殖し<sup>4)5)</sup>，また原生動物は水垢に多く存在することから，注湯口・浴槽周辺のふきとり検査を実施し，水垢の関与についても調査を実施したので報告する。

### 2 材料及び方法

#### 2.1 調査対象・項目

平成12年9月18日から10月27日まで県内の温泉旅館や

\* 現 仙南仙塩広域水道事務所

保養施設の30施設を対象に調査を行った。

細菌検査としてレジオネラ属菌の分離・同定・血清型別及び菌数，一般細菌数測定を実施し，更にレジオネラ属菌生息環境として水温，残留塩素，pH，電気伝導度を測定した。

#### 2.2 レジオネラ属菌の検出

温泉水は貯湯タンク・注湯口・浴槽から各500mLを採水し，その200mLを検体とした。また，ふきとりは水垢の調査をするために注湯口周辺・浴槽内側・浴槽周辺・湯室床を滅菌ガーゼ（約5cm<sup>2</sup>）で10cm四方をぬぐい，滅菌蒸留水で10mLにメスアップしたものを検体として検査を行った。

検査方法は「新版レジオネラ防止指針」に基づいて冷却濃縮遠心法で行い，分離はWYO寒天培地（OXOID）， $\alpha$ -B. B selective BCYE寒天培地（極東）を使用した<sup>6)</sup>。分離した菌株は性状確認試験とPCR法で属・種の決定を行い，市販の抗血清で血清型の同定を行った。（図1）

検体（ふきとり10mL、温泉水200mL）

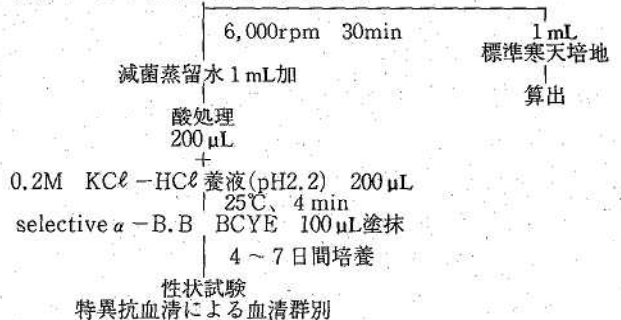


図1 冷却濃縮遠心法

### 3 結 果

#### 3.1 レジオネラ属菌の検出状況

##### 3.1.1 温泉水検査

30施設の温泉水101件についてレジオネラ属菌の検査をした結果を表1に示した。温泉水101件中28件(28%)からレジオネラ属菌が検出された。更に、検出されたレジオネラ属菌を採水場所別に検出率を比較すると貯湯タンク5%,注湯口14%,浴槽41%で、源泉に近いところから温泉水の流れにしたがって貯湯タンク,注湯口,浴槽と検出率が高くなることが明らかになった。また検出されたレジオネラ属菌の種は,96.1%が*L. pneumophila*であった。この*L. pneumophila*と確認された株について市販の抗血清で血清型を同定したところ,43.8%が「血清群4」,「血清群5」,「血清群6」であった。(表2)

表1 温泉水検査のレジオネラ属菌検出状況

	貯湯タンク	注湯口	浴槽	計
検体数	1/20	3/23	24/58	28/101
陽性率	5%	14%	41%	28%

表2 検出されたレジオネラ属菌の血清型別

血清型	検出数	検出率
<i>L. pneumophila</i> SG1	5	7%
<i>L. pneumophila</i> SG2	2	3%
<i>L. pneumophila</i> SG3	1	1%
<i>L. pneumophila</i> SG4	10	13%
<i>L. pneumophila</i> SG5	11	14%
<i>L. pneumophila</i> SG6	11	14%
<i>L. pneumophila</i>	33	43%
<i>Legionella spp.</i>	3	4%
計	76	100%

##### 3.1.2 ふきとり検査

浴槽周辺等のふきとり検査の結果を表3に示した。その結果,ふきとり検体75件中27件(36%)からレジオネラ属菌が検出された。検出されたレジオネラ属菌を採取場所別に検出率をみると注湯口周辺40%,浴槽周辺35%で,温泉水検査と同様の結果であった。

表3 ふきとり検査のレジオネラ属菌検出状況

	注湯口周辺	浴槽周辺	計
検体数	8/20	19/55	27/75
陽性率	40%	35%	36%

##### 3.1.3 検体別のレジオネラ属菌検出状況

温泉水検査とふきとり検査の両方を実施し,レジオネ

ラ属菌が温泉水検査のみで検出された浴槽とふきとり検査のみで検出された浴槽,両方の検査で検出された浴槽の併せて32件について,レジオネラ属菌の検出数を比較した。(図2)その結果,温泉水検査のみの場合はレジオネラ属菌を23件検出し,また,ふきとり検査のみの場合は19件検出した。

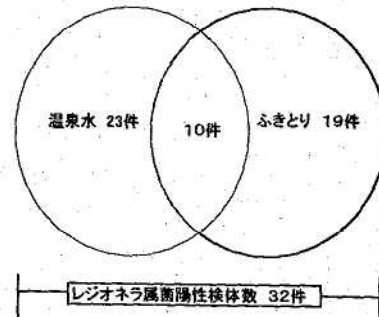


図2 検体別のレジオネラ属菌検出状況

#### 3.2 一般細菌数, pH, 残留塩素, 水温

レジオネラ属菌生息環境として測定した各項目の結果とレジオネラ属菌の検出状況を比較した。

一般細菌数・pHとレジオネラ属菌の検出率の間に相関は認められなかったが,水温と残留塩素濃度はレジオネラ属菌の検出との間に相関が認められた。

水温が33.6~44.5℃ではレジオネラ属菌は高率に検出されたが,水温が50℃以上の温泉水からはレジオネラ属菌は検出されなかった。また,残留塩素が0.2mg/L未満の温泉水からは高率にレジオネラ属菌が検出されたが,0.2mg/L以上の温泉水では検出されなかった。(図3-1, 3-2, 3-3, 3-4)

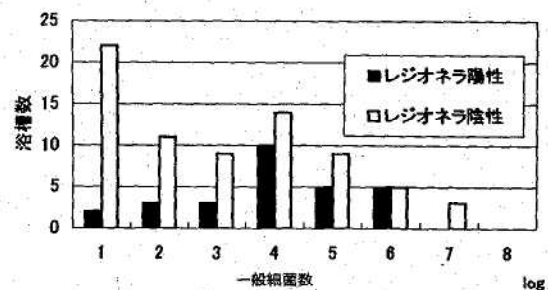


図3-1 温泉浴槽水の一般細菌数とレジオネラの有無

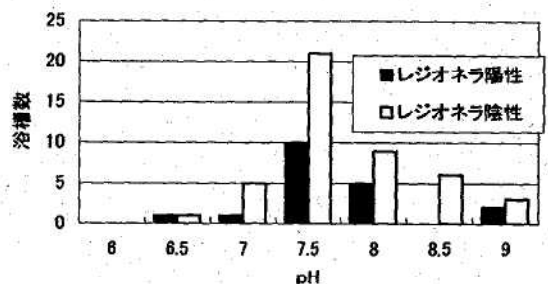


図3-2 温泉浴槽水のpHとレジオネラの有無



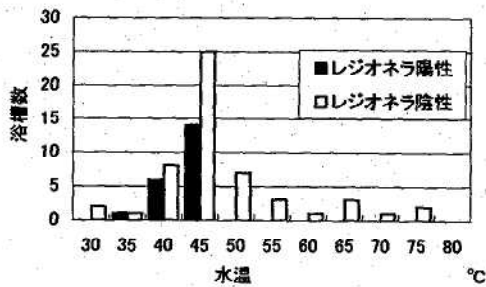


図3-3 温泉浴槽水の水温とレジオネラの有無

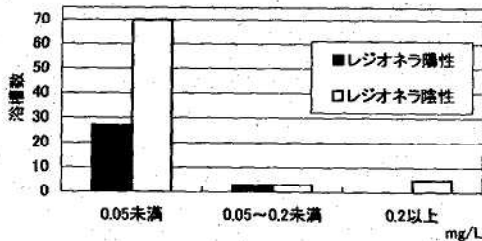


図3-4 温泉浴槽水の残留塩素とレジオネラの有無

#### 4 考 察

今回の調査では温泉浴槽水は清掃・換水後に採水した施設が多かったため、浴槽水のみを対象としたレジオネラ属菌の検出率はこれまでの報告より低く40%程度であったが<sup>(4),7)</sup>、温泉水もレジオネラ属菌に汚染されている可能性が示唆された。

一方、レジオネラ属菌は原生動物（アメーバ）の細胞内で増殖することが報告され、アメーバは水垢から高率に検出される。このことから今回、我々は浴槽周辺等のふきとり検査を行ない水垢とレジオネラ属菌の関係を明らかにすることを目的として調査を実施した。その結果、ふきとり検査でも温泉水と同様にレジオネラ属菌の検出率は高く36%であった。しかし、同じ箇所調査において浴槽水からレジオネラ属菌が検出してもふきとり検体から検出しない場合や浴槽水からレジオネラ属菌が検出されなくてもふきとり検体から検出される場合があるなど、浴槽水と水垢の検査結果は必ずしも一致しなかった。しかし、このように従来どおりの温泉水検査に加えて注湯口・浴槽周辺のふきとり検査を併せて行ったことにより、レジオネラ属菌の定着あるいは増殖に水垢が関与することを確認した。そのことから、レジオネラ属菌の汚染を防止する一つの方法として、貯湯タンクから浴槽までの施設全体の汚染状況調査を実施し、汚染箇所の水垢等をブラッシングにより徹底して清掃することが有効であると考えられた。

また菌が検出されたほとんどの温泉施設では浴槽水の残留塩素濃度が検出限界以下で、水温も40℃前後であった。このことから、温泉水はレジオネラ属菌の生息しやすい環境であることが改めて確認された。

平成12年12月に「公衆浴場における水質基準等に関する指針」が改訂され、レジオネラ属菌に関する項目が追

加されたことによりレジオネラ属菌の汚染実態を把握する必要性はさらに高まったといえる。そのため、今後も継続調査を実施し、実態の把握とその対応について検討したいと考える。

#### 5 謝 辞

本調査を行うにあたり環境生活部生活衛生課、仙南・大崎保健所の担当職員の方々に多大なるご協力を賜り深く感謝します。

#### 参 考 文 献

- 1) 特集レジオネラ属菌とレジオネラ症，臨床と微生物，25，1（1998）
- 2) Fraser, D.W.T.R.Tsai, W.Prenstein, M.E.Packin, H.J.Beecham, R.G.Sharrar, J.Harris, G.F.Mallison, S.M.Martin, J.E.McDade, C.C.Shepard, P.S.Brach and Field Invest, Team: Legionnaire's disease; Description of epidemic of pneumonia, N.Engl.J.Med, 29, 1189-1197 (1997)
- 3) 特集レジオネラ症，病原微生物検出情報21, 186-193 (2000)
- 4) 黒木俊郎他：神奈川県下の温泉浴槽水中における Legionella 属菌と自由生活性アメーバ調査，感染症学雑誌，72, 1056-1063 (1998)
- 5) 全国旅館環境衛生同業組合連合会：改訂レジオネラ属菌防除指針（1999）
- 6) 厚生省生活衛生局監修：新版レジオネラ症防止指針，財団法人ビル管理教育センター（1999）
- 7) 黒川忠：宮城県仙北地方の温泉水におけるレジオネラの汚染状況調査，東北大学医療技術短期大学部紀要，6, 1 (1997)

## 県内の入院施設で集団発生した感染性胃腸炎から検出された NVの遺伝子解析

### Genetic Analysis of *Norwalk virus* (NV) Detected from Nonbacterial Gastroenteritis Patients Occurred in Hospital

植木 洋 有田 富和 後藤 郁男  
佐藤 千鶴子 沖村 容子 白石 廣行  
秋山 和夫\*<sup>1</sup> 大島 武子\*<sup>2</sup>

Yo UEKI, Tomikazu ARITA, Ikuo GOTO  
Chizuko SATO, Yoko OKIMURA, Hiroyuki SHIRAIISHI  
Kazuo AKIYAMA, Takeko OSHIMA

キーワード：*Norwalk virus* (NV), 感染症胃腸炎, 二次感染, 遺伝子解析

Key Words: *Norwalk virus* (NV), Nonbacterial Gastroenteritis, Secondary spread,  
Genetic Analysis

1999年12月県内の入院施設で感染性胃腸炎の集団発生が1ヶ月にわたり確認された。病原因子を検索した結果、患者便、咽頭拭い液からPCR法で*Norwalk virus* (以下NV) が検出され、遺伝子解析によりすべてG2型であることが判明した。また、同一患者が2～4週間にわたりウイルスを排泄していた例も認められ、長期間感染源であった可能性が示唆された。さらに、患者の咽頭拭い液からNV遺伝子が検出されたことは、飛沫感染による二次感染の可能性も推測された。

#### 1 はじめに

*Norwalk virus* (NV) は、かきを中心とする二枚貝から検出されることが多いために、かき喫食に関連した食中毒事例の原因物質として知られている<sup>1)</sup>。またこのウイルスは、感染性胃腸炎の主要な原因ウイルスでもあり、その感染様式は糞口感染によるヒト～ヒト感染が主であるといわれている<sup>2)</sup>。しかし近年、飛沫感染を示唆する事例報告もあり、新たな感染経路として注目されている<sup>3)</sup>。現在、NVは遺伝学的に大きく3つのグループに分類され、その中でヒトに感染性を示すのはGenotype 1 (G1) 型及びGenotype 2 (G2) 型である<sup>4)</sup> が遺伝子型による病原性については不明である。

今回我々は、県内の入院施設で約1ヶ月間にわたり継続発生した急性胃腸炎事例を経験し、有症者の吐物・咽頭拭い液・糞便及び無症状者の咽頭拭い液・糞便からNV遺伝子の検出を行った。その結果、同一人から採取した複数の検体からNV遺伝子を検出した例や長期にわたりNVを排泄していた例も確認されたので、検出された遺伝子について解析し比較検討を行った。

#### 2 材 料 (表-1)

今回の事例で採取した糞便191、吐物19、咽頭拭い液44件を対象にNV遺伝子検出検査を行った。

#### 3 方 法

糞便、吐物からの遺伝子の抽出はガラスパウダー法(旭硝子株式会社)、咽頭拭い液はIsogen-LS (株式会社ニッポンジーン)で行った。遺伝子の検出はYuri系プライマー<sup>5)</sup>を用いたRT-PCRを行った後、nested-PCR法を実施し、遺伝子が検出された検体については、食品衛生法に従いサザンハイブリダイゼーションで確認した。サザン陽性の検体の一部については、PCR産物をダイレクトシーケンス法で塩基配列の決定を行った。

#### 4 結 果

##### 4.1 発生状況 (図-1, 表-2)

今回急性胃腸炎の集団発生が確認された施設は重度心身障害者の入院施設で、患者が発生した3病棟(A・B・C病棟)は中庭を囲む形で配置されていた。また、病室間は看護の都合上比較的自由に行き来することが可能な構造であった。最初の患者は1999年12月22日に確認され、2日目には27名とピークになり、2000年1月30日

\* 1 現 仙台保健福祉事務所塩釜総合支所

\* 2 国立療養所宮城病院

表-1 検査材料(延べ検体数)とPCR検査結果

病棟 (名)	糞便	吐物	咽頭 拭い液
A (40)	36/78	2/6	0/13
B (41)	33/54	5/10	1/13
C (41)	29/59	1/3	2/18
計 (122)	98/191 (51.3%)	8/19 (42.1%)	3/44 (6.8%)

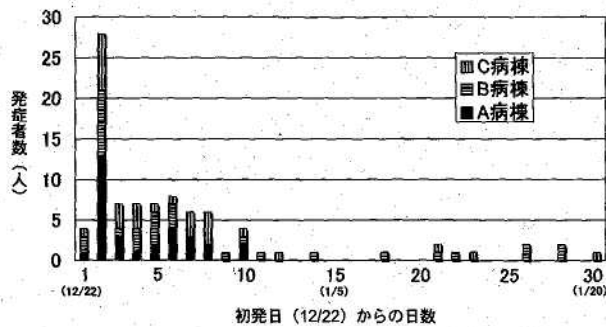


図-1 患者発生状況

までの約1ヶ月間にわたり継続的に発生し合計85名が発症した。初発から6日目までは各病棟で発症者が確認されたが、その後A病棟を除く2つの病棟で継続し発生した。病棟ごとの発症者及び発症率は、A病棟入院患者40名中28名、B病棟41名中28名、C病棟41名中29名が発症し、発症率はそれぞれ70.0%、68.3%、70.7%で病棟間における発症率に大きな差は認められなかった。発症者の主症状は、下痢、嘔吐、発熱であったが、施設の状態から吐き気等の症状についての詳細は不明であった。

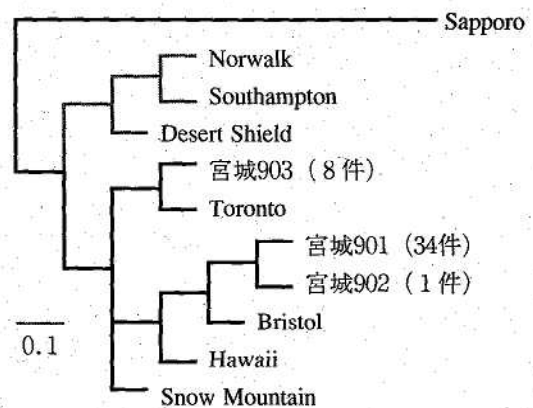
4.2 遺伝子検索及び解析(表-1, 図-2)

発症者85名中45名からNV遺伝子が検出された。検体別の検出状況は、糞便191件中98件(検出率51.3%)、吐物19件中8件(42.1%)、咽頭拭い液33件中4件(6.8%)であった。さらに、病棟別・検体別検出状況を表-1に示す。糞便、吐物からの検出状況については、B病棟での検出率が高かったが、A及びC病棟ではほとんど差が認められなかった。咽頭拭い液については、B、C病棟では検出されたがA病棟では検出されなかった。また、発症後経時的に検体を採取できた症例についてPCR検査を行った結果、28日間にわたりウイルスを排泄していた例が確認された。

NV遺伝子が検出された材料中43例を対象に(同一人からの採材した複数の検体も含む)シーケンスを行い、RdRP領域の259bpについて塩基配列を決定後、NJ法で分

表-2 病棟別発症者数

病棟	発症者 (%)	未発症者 (%)
A	28(70.0)	12(30.0)
B	28(68.3)	13(31.7)
C	29(70.7)	12(29.3)
計	85(69.7)	37(30.3)



RNAポリメラーゼ領域の259bp NJ法で作成(GENETYX-Mac)

図-2 検出されたNV遺伝子の分子系統樹

子系統樹を作成した。その結果、Bristol株近縁株が34件(宮城901株)、同株と2塩基違いが1件(宮城902株)、さらにTronto株近縁株が8件(宮城903株)に分類された。最も多く検出されたのは宮城901株で、シーケンスを行った検体の67.4%にあたる29件が同株であった。また、宮城901株及び903株は3種類の検体から検出されたが宮城902株は糞便からのみ検出された。

4.3 症例別遺伝子検索(図-3, 図-4)

長期にわたりNVを排泄していた症例: 症例Iは初発患者が確認された翌日に発熱・下痢により発症し、2病日に採取した糞便から宮城901株が検出された。有症期間は2日間であったが、症状が快復した後の28病日までに採取された糞便から同株のみ8回検出した。症例II及びIIIについても有症期間は1ないし2日間であったにも拘わらず、それぞれ2日、8日後及び14日、17日、22日後に採取した糞便から、症例Iと同じ宮城901株が検出された。

同一人の異なる検体から検出された遺伝子: 症例IVは、宮城901株が発症日の吐物、さらに14日、17日、22病日の糞便から検出された。また、症例Vは2病日の咽頭拭い液から宮城901株が検出され、その7日後に採取した糞便からも同型が検出された。さらに、症例VIは咽頭拭い液から宮城903株が検出された時点では発症が確認さ

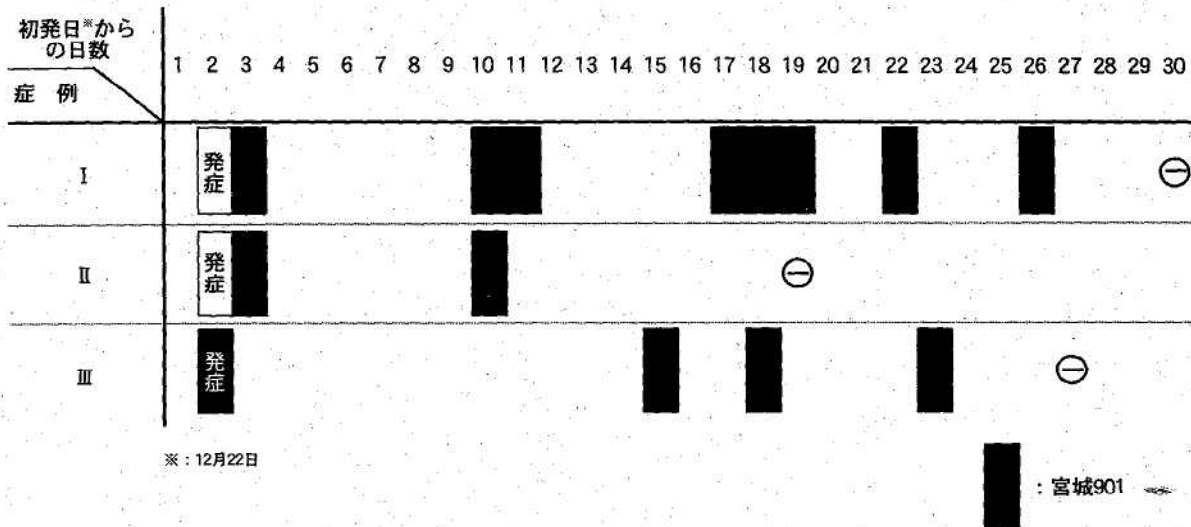


図-3 長期にわたり糞便からNVが検出された症例の遺伝子型

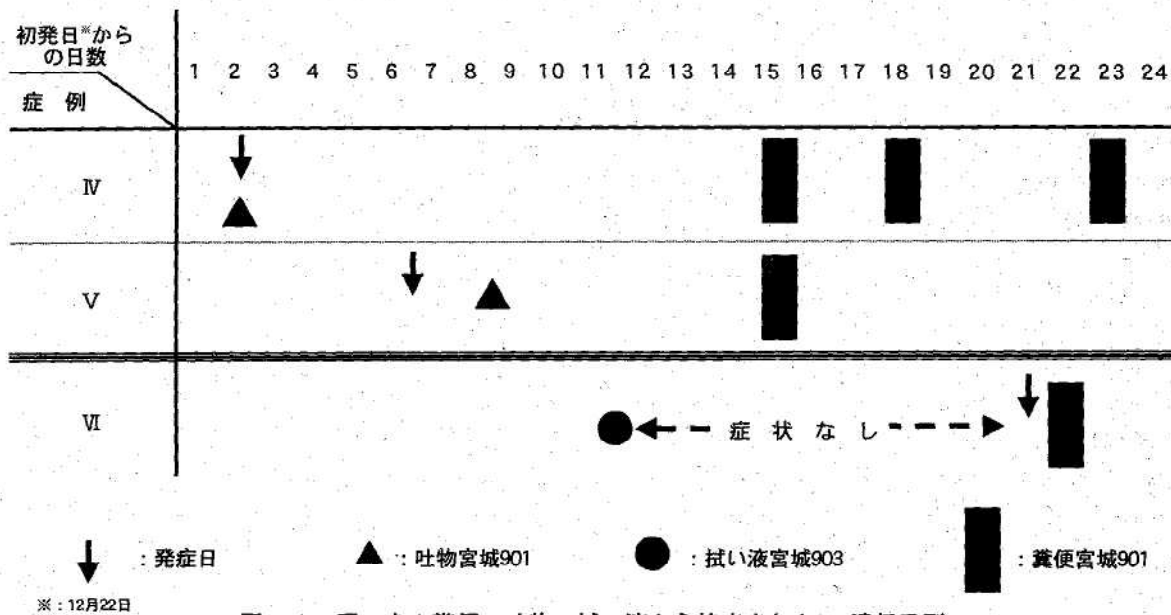


図-4 同一人の糞便・吐物・拭い液から検出されたNV遺伝子型

れなかったが、10日後に発症し翌日に採取した糞便から宮城901株が検出された。

### 5 考 察

今回の事例の特徴は、初発の原因は不明であったが、NVの潜伏時間や検出されたNVの遺伝子型の多様性が少ないことから、施設内で同一株による二次感染や三次感染が起こったと推測され、新規患者の発生が約1ヶ月間継続したと考えられる。

従来感染性胃腸炎の感染様式は糞口感染が主であると報告されているが、NVによる感染はウイルス粒子が100個未満でも成立すること<sup>6)</sup>を考慮すると、本施設のような閉鎖性施設においては飛沫感染もありうると推測される。特に今回の事例では、症咽頭拭い液からNVが検出されなかったA病棟では、発症が約1週間で収束したが、

検出が確認されたB及びC病棟では約1ヶ月間にわたり新規患者の発生が継続した。この間、二次感染や三次感染した症例の中には糞口感染に加えてや飛沫感染による感染事例があったと考えられる。

NV遺伝子の多様性と病原性の関係については、ほとんど議論されていない。そこで、宮城901及び903株が検出された有症者12名の臨床症状を比較した。NV感染症の典型的な症状である嘔吐・下痢を呈した有症者は宮城901株検出者で11名、宮城903株検出者は1名と出現した症状に差が認められたほか、宮城903株検出者の中に2名の不顕性感染者が認められた。また、有症期間は、宮城901株検出者の平均が2.0日であったのに対し903株検出者は1.6日と僅かに短かった。さらに、宮城903株が検出された時点で症状が出現せず、発症後宮城901株が検出された症例が2例認められた。これらのことから、Bristol

株近縁の宮城901株とTronto株に近縁の宮城903株では病原性が異なる可能性が示唆された。しかし、調査対象者が少ないため、今後各種の事例において追跡調査し詳細に検討する必要がある。

## 6 ま と め

- 1) 今回の事例は、原因不明であったが、長期にわたりNVを排泄していた患者を原因とした糞口感染、さらに吐物・咽頭拭い液からNVが検出されたことから、飛沫も加わり集団感染が長期化したと推測された。
- 2) 検出されたNVの遺伝子型と患者の臨床症状を考察した結果、遺伝子型により症状の発現に違いが認められた。

## 文 献

- 1) 国立感染症研究所：IASR, ウイルス性胃腸炎集団発生1997. 10～1999. 9, vol.20, No11. 1999
- 2) 中田修二：ロタウイルス・ノーウオークウイルス感染症, 小児科診療, 64, 7, 2001
- 3) Cheesbrough JS, Green J, Gallimore CI, Wright PA, Brown DW : Widespread environmental contamination with Norwalk-like viruses (NLV) detected in a prolonged hotel outbreak of gastroenteritis. *Epidemiol Infect* 2000; 125 : 93-8
- 4) U.S. DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES : "Norwalk-Like Viruses, 50, RR-9, June 1, 2001
- 5) Saito H, Saito S, Kamada K, et. al : Application of RT-PCR designed from sequence of the local SRSV strain to the screening in vial gastroenteritis outbreaks, *Microbiol. immuno.*, 42, 439-446, 1998
- 6) Kapikian AZ, Estes MK, Chanock RM. Norwalk group of viruses. In : Fields BN, Knipe DM, Howley PM, eds. *Fields virology*. 3rd ed. Philadelphia, PA : Lippincott-Raven, 1996 ; 783-810

## 宮城県における麻疹抗体保有状況

## Measles Antibodies Prevalence in Miyagi Prefecture

佐藤 千鶴子 後藤 郁男 植木 洋  
沖村 容子 白石 廣行Chizuko SATO, Ikuo GOTO, Yo UEKI  
Yoko OKIMURA, Hiroyuki SHIRAISHI

キーワード：麻疹ウイルス，粒子凝集反応法（PA法），抗体保有率，ワクチン

Key Words : Measles Virus, Particle Agglutination Test (PA Test), PA Antibody Positive Rates Vaccine

平成12年度感染症流行予測調査により、宮城県における麻疹抗体保有状況を調査した。調査対象者547名全体の抗体保有率は96.5%であった。年齢群別には6才以下で低い傾向が認められ、特に0～1才で75.0%と最も低かった。20才以上ではほぼ100%の保有率を示したが、抗体価は年齢とともに低下する傾向が認められた。ワクチン接種者の抗体保有率は98.9%で、未接種者の85.1%と比べ高い抗体獲得を示しており、ワクチンの効果は明確であったが、ワクチン接種者で3名の抗体陰性者が認められた。低年齢における予防接種の勧奨と抗体持続の面からの追加接種の必要性が考えられた。

## 1 はじめに

麻疹は、麻疹ウイルスを病原体とするヒトの急性疾患である。高熱、結膜炎、発疹などの全身症状を呈し、口腔粘膜に現れるコプリック斑が特徴的で、通常発症から2週間程度で回復するが、肺炎、脳炎、気管支炎等の合併症を伴った場合死に至る事もある。また、10万例に1例の割合で亜急性硬化性全脳炎（SSPE）が発生することも知られている<sup>1)2)</sup>。我が国では麻疹の流行を防止するため、1960年代に弱毒生ワクチンの開発を行い、予防接種を開始した。1978年に定期接種となり、麻疹患者報告数は激減している。しかし、現在のワクチン接種率は75%前後で推移しているため<sup>2)3)</sup>、小児を主とした地域的な小流行が繰り返されると共に成人の感染例も報告され問題となっている<sup>4)</sup>。このような流行を予測し予防接種計画を策定する事を目的に、厚生省流行予測調査において麻疹抗体検査が1978年より断続的に行われており、今回我々も本調査において麻疹抗体保有状況を調査し、併せてワクチンの効果についても検討したので報告する。

## 2 材料および方法

平成12年感染症流行予測調査の一環として、抗体検査を承諾した県内在住の9年齢群547名を対象に麻疹抗体調査を行った（表1）。

血清中の麻疹ウイルスに対する抗体は、富士レリオ社製麻疹ウイルス抗体価測定キット「セロディアー-麻疹」を用い

て測定した。この方法は、ゼラチン粒子に麻疹ウイルス抗原を吸着させたものと、血清中の麻疹抗体とが反応し凝集

表1 年齢群別件数の内訳

年齢群(才)	全対象者	ワクチン接種者	未接種者
0～1	8	4	4
2～3	23	21	2
4～6	81	67	12
7～9	31	28	2
10～14	60	53	6
15～19	61	50	5
20～29	102	28	11
30～39	71	8	15
40以上	110	3	30
総計	547	262	87

U型マイクロプレート第1穴から最終穴まで希釈液を滴下(25 $\mu$ l)↓  
血清を第1穴目に25 $\mu$ l入れて2段階希釈↓  
第2穴目に未感作粒子を25 $\mu$ l滴下  
第3穴目以降に感作粒子を25 $\mu$ l滴下↓  
トレイミキサーで30秒混和後2時間静置↓  
判定未感作粒子が凝集していないことを確認  
感作粒子が凝集している穴の最終希釈倍数が抗体価

図1 PA法の測定操作

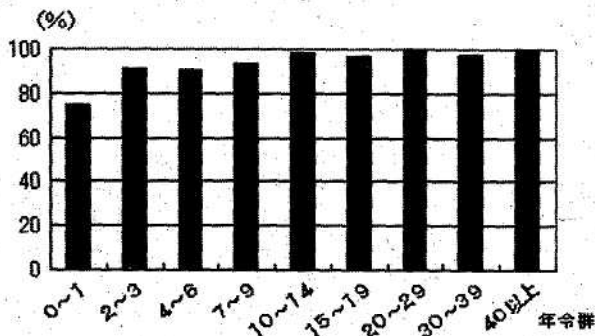
することを応用した粒子凝集反応法 (Particle Agglutination Test: PA法) である。測定操作は図1に示したとおりで、抗体価16倍 (2<sup>4</sup>) 以上をPA抗体陽性と判定した。

### 3 結 果

#### 3.1 PA抗体保有状況

図2に各年令群のPA抗体保有率を示した。対象者数は各年令群で異なるが、0~1才群で75.0%, 2~3才群で91.3%, 4~6才群で90.1%と低年令群で低い傾向が認められた。10才以上では、96.7~100%という高い保有率であったが、10~14才群で1名、15~19才と30~39才群で各2名の抗体陰性者を確認した。

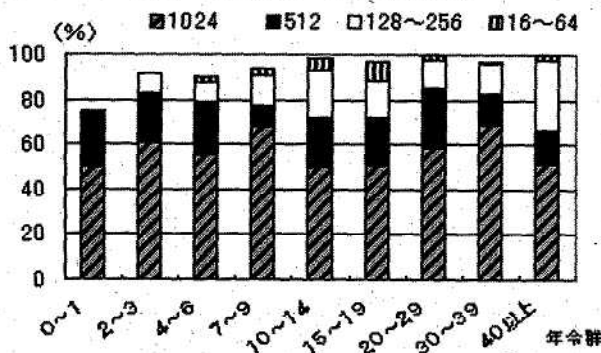
図2 PA抗体保有率



#### 3.2 PA抗体価分布

各年令群のPA抗体陽性者の抗体価を16~64倍, 128~256倍, 512倍, 1024倍以上の4段階に分け、その割合を図3に示した。その結果、0~1才群の抗体陽性者のPA抗体価は、全例512倍以上であるが、2才以上では16倍や128倍などの低い抗体価も認められた。また、512倍以上の抗体陽性者は年令群により多少の変動が認められるが、40才以上で明らかに減少していた。

図3 年令群別PA抗体価保有率



#### 3.3 ワクチン接種歴別PA抗体保有状況

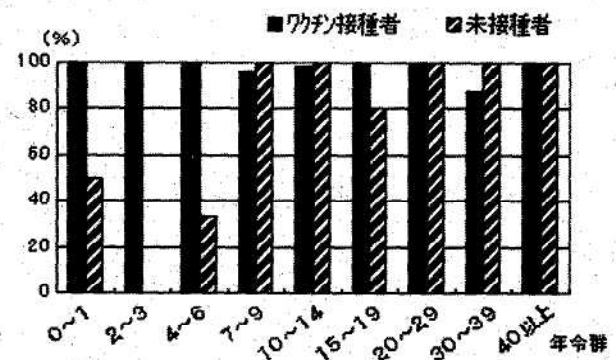
ワクチン接種歴別PA抗体保有状況を図4に示した。ワクチン接種の有無は、母子手帳で確認し不明な対象者を除外したため、20才以上ではワクチン接種の明確な対象

者は極端に少なくなっている (表1)。

ワクチン接種者は、262名中259名 (98.8%) が抗体を保有しており、ワクチン未接種者の抗体保有率85.1%と比べワクチンによる抗体獲得は明らかであった。但し、7~9才, 10~14才, 30~39才群で各1名の抗体陰性者が確認された。

一方、ワクチン未接種者は、0~6才の各年令群で50.0%, 0%, 33.3%と低い抗体保有率を示しているが、7才以上の年令群では、約100%が抗体を保有していた。これらの抗体は自然感染によるものと考えられ、また、定期接種の対象群である0~1才でも2名が自然感染を受けており、地域的流行の存在を示していた。

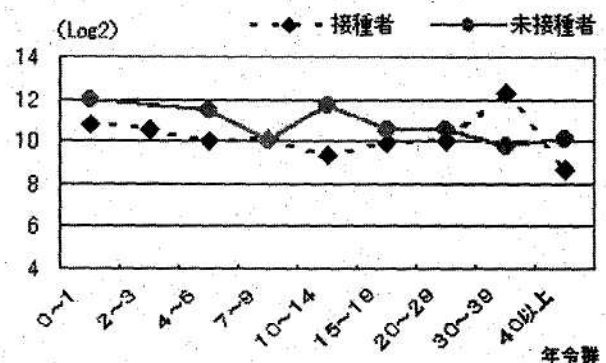
図4 ワクチン接種歴別PA抗体保有率



#### 3.4 ワクチン接種歴別幾何平均抗体価

各年令群の幾何平均抗体価を図5に示した。PA抗体価測定は、2段階希釈により行うため、平均抗体価をLog<sub>2</sub>の対数で表示した。未接種者に抗体保有者がいなかった2~3才群を除いて各年令群を比較すると、7~9才と30~39才群で接種者の平均抗体価が高い以外は、全ての年令群で自然感染を受けたと考えられる未接種者の抗体価が高かった。しかし、全体の平均抗体価を比較すると、接種者が2<sup>10.2</sup> (1142.6), 未接種者で2<sup>10.4</sup> (1318.7) とほとんど差が認められなかった。

図5 ワクチン接種歴別幾何平均抗体価



#### 3.5 ワクチン接種者における抗体陰性者

今回の調査でワクチン接種者262名中3名の抗体陰性者が認められた。30代の1名は単独ワクチン接種者であったが、7～9才と10～14才の各1名はMMRワクチン接種者であった。

MMRワクチンは1989年～1993年4月まで麻疹の定期接種の際、希望者に接種されており、今回7～14才の年齢群にMMRワクチン接種歴を確認した。この年齢群における単独ワクチン接種者とMMRワクチン接種者の抗体価の比較を表2に示した。平均抗体価は7～9才で単独ワクチン接種者が、10～14才ではMMRワクチン接種者が低いという結果であり、MMRワクチンの持続性に疑問を示す結果であった。

4 考 察

今回の成績から、抗体保有率は低年齢群で低い傾向が確認された。宮城県では図6に示したとおり、毎年小規模の流行が報告されており、麻疹ウイルスの侵入があった場合は、これらの年齢群が感染対象者になることは明確である。また、ワクチン未接種者は、7才以上ではほぼ100%が抗体を保有しており、集団生活が始まる年齢から自然感染が進行していることが明らかで、県内の麻疹ウイルスの活動を示すものである。特に、ワクチン接種対象年齢前に感染する例も判明した。このような麻疹流行の抑止には、ワクチン接種率を95%以上にする必要があり<sup>3)</sup>、個人防御を考えるうえでもワクチン接種等の啓蒙が必要であると考えられた。

一方、ワクチン接種者の抗体保有率は98.9%で、抗体の獲得は明確であった。抗体価においても自然感染者と大きな差は無く、ワクチンの有効性を示している。しかし、3名の抗体陰性者が確認されたことは、ワクチン接種者でも流行時における感染の可能性を示唆している。実際、宮城県石巻市における2000年48週からの麻疹の流行では、ワクチン未接種の1才児が流行の中心であったが、ワクチン接種歴のある小学生3名にも感染が確認さ

表2 単独ワクチンとMMRの幾何平均抗体価

年齢群	単 独		MMR	
	対象者数	抗体価	対象者数	抗体価
7～9才	21	820.3	7	1448.2
10～14才	29	715.5	24	577.6

れた<sup>4)</sup>。このことはワクチン接種者でも感染防御に十分な抗体価を得られない対象者の存在を意味している。

近年、全国的に成人の麻疹罹患が問題となっているが、今回我々も成人麻疹の対象年齢（18才以上）で4名の抗体陰性者を確認した。さらに年齢と共に抗体価が低下する事も明らかとなり、今後無自覚な抗体陰性者の蓄積が懸念され、成人麻疹について注意を喚起する必要があるものと思われた。

5 ま と め

- (1) 抗体陰性者の多い低年齢層へワクチンの有効性を啓発し接種率の向上をはかる必要がある。
- (2) ワクチン接種者は98.9%が抗体を保有しており、ワクチンによる抗体獲得は明確であった。
- (3) ワクチン接種者や成人においても、麻疹に罹患する可能性があるため、ワクチンの追加接種を視野に入れた麻疹対策を今後検討すべきであると考えられる。

参 考 文 献

- 1) 国立予防衛生研究所学友会：ワクチンハンドブック，157～169（1996）
- 2) 小出雄彦：最新予防接種の知識，60～71（1993）
- 3) 感染症情報センター：病原微生物検出情報，Vol. 20，No 2，1～3（1999）
- 4) 小船登美男他：臨床とウイルス28，10～14（2000）
- 5) 白取博志他：宮城県保健環境センター研究発表会要旨集第19回，28（2000）

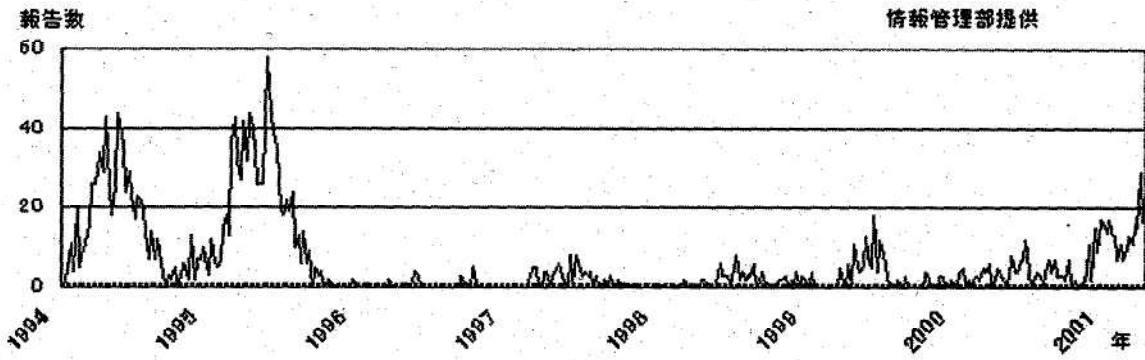


図6 宮城県における麻疹患者報告数の推移