

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*¹ 佐々木 美江
畠山 敬 御代田 恭子*² 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¹⁾が報告した*tyv* (*rfbE*), *pri* (*rfbS*), *fliC-d*およびHashimotoら²⁾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¹⁾の方法に従った。

ペロ毒素遺伝子の検出はPollard³⁾のプライマー、*vh2*バリエーションの検出にはYamazaki⁴⁾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 ₂ S	(-)	(+)
	ガ ス	(-)	(-)
LIM	Lys	(+)	(+)
	Ind	(-)	(-)
	Mo	(-)	(+ ^W)
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。

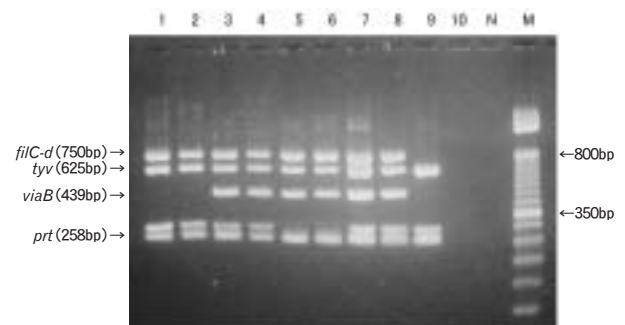


図1 PCR泳動像

- 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 ^{*1}	2	14	7	0
3類感染症 ^{*2}	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。

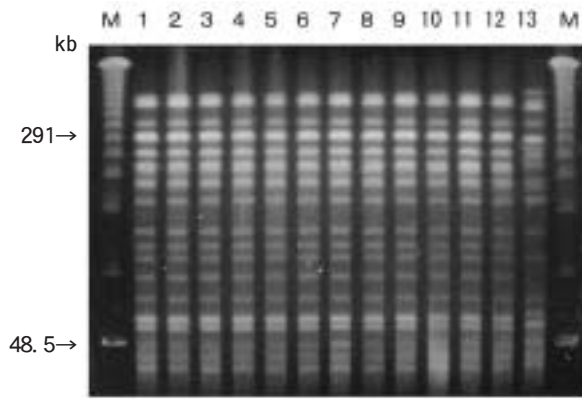


図2 PFGE泳動像

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⁵⁾）、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⁶⁾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.