

# 山梨県における細菌性赤痢の 分離状況と細菌学的検討 (2001)

大沼正行 野田裕之 金子通治

Bacteriological Studies on Bacillary Dysentery in Yamanashi Prefecture (2001)

Masayuki OHNUMA, Hiroyuki NODA and Michiharu KANEKO

## はじめに

細菌性赤痢は水系感染症の代表的な原因菌のひとつであり、1960年代までは国内での集団事例も多く重要な下痢起因菌であった。近年は、上下水道の整備および衛生環境の改善により、以前のような国内での集団事例は減少してきた。しかし、散発ではあるが海外旅行者による輸入事例も多くなっており、現在でも注意が必要な感染症のひとつである。

山梨県においては、集団事例は1990年忍野村で発生した事例<sup>1,2)</sup>が最後であり、散発事例は毎年数例ずつ発生している。しかし、2001年度は家族内集団事例や、同一原因食品によると思われる事例などが重なり例年になく赤痢菌が多く分離された。今回は、2001年度に分離された赤痢菌について、その事例の概況と分離菌の諸性状について報告する。

## 材料と方法

### 1. 調査期間および調査対象

2001年4月から2002年3月までの1年間に県内で発生した細菌性赤痢事件を対象とした。

### 2. 赤痢菌の同定

赤痢菌の同定は常法<sup>3)</sup>に従い、生化学および血清学的性状検査から赤痢菌と同定し、その血清型を決定した。

### 3. 薬剤感受性試験

NCCLS法の規格に準拠した一濃度ディスク法 (BBL センディディスク) により測定した。使用薬剤は、サルファ剤がスルファメトキサゾール (SA)、ストレプトマイシン (SM)、テトラサイクリン (TC)、クロラムフェニコール (CP)、カナマイシン (KM)、アミノベンジルペニ

シリン (ABPC)、セファロチン (CET)、セフォキシチン (CFX)、ラタモキシセフ (LMOX)、スルファメトキサゾールとトリメトプリムの合剤 (ST)、ノルフロキサシン (NFLX)、ホスホマイシン (FOM)、ゲンタマイシン (GM)、トリメトプリム (TMP)、ドキシサイクリン (DOXY)、セフォタキシム (CTX)、シプロフロキサシン (CPFX)、およびナリジクス酸 (NA) の18薬剤である。

### 4. プラスミドプロファイル

プラスミドプロファイルは、KadoとLiuの方法<sup>4)</sup>に準拠して行った。1晩培養した供試菌のプラスミドDNAを抽出後、0.65%のアガロースを使用し、100Vで約2時間30分電気泳動した。アガロースゲルをエチジウムブロマイド液に浸し、プラスミドDNAを染色、水洗後に紫外線照射下で撮影しプラスミドを観察した。

### 5. パルスフィールド電気泳動法 (PFGE) によるDNA分析

国立感染症研究所の方法<sup>5)</sup>に準拠した。染色体DNAを制限酵素 *Xba*I および *Bln*I を用い、37°Cで一晩処理した。切断されたDNAを1%のアガロースで11°C、22時間電気泳動し、エチジウムブロマイドで染色後、紫外線照射下で撮影し、パターン分析した。

## 結果および考察

### 1) 家族内事例

2001年6月30日、吉田保健所に管内の病院より、赤痢患者発生の届け出があった。患者は保育園児で6月24日から下痢、発熱、腹痛の症状を呈していた。患者家族の検便および保育園の聞き取り調査などを行ったところ、患者の父親から赤痢菌が分離された。そこで、普段交流のある親戚や職場を中心に接触者の検便を実施し

表1 2001(平成13年)度 赤痢菌分離状況

菌株 No.	年齢・性	分離月日	薬剤感受性試験	患者保菌者	備考
1	19・F	4. 16	SA,SM,TC,ST,TMP,DOXY	患者	バンコクへ旅行
2	26・M	5. 7	SA,SM,TC,NA,ST,TMP,DOXY	保菌者	インドへ旅行
3	5・F	6. 27	SA,SM,TC,NA,ST,TMP,DOXY	患者	吉田保健所管内
4	32・M	7. 1	SA,SM,TC,NA,ST,TMP,DOXY	保菌者	〃
5	69・F	7. 4	SA,SM,TC,NA,ST,TMP,DOXY	〃	〃
6	9・M	7. 4	SA,SM,TC,NA,ST,TMP,DOXY	〃	〃
7	5・F	7. 4	SA,SM,TC,NA,ST,TMP,DOXY	〃	〃
8	70・F	7. 9	SA,SM,TC,NA,ST,TMP,DOXY	〃	〃
9	7・M	8. 22	SA,ST,TMP	患者	国内散发事例
10	28・F	10. 12	SA,SM,TC,ST,TMP,DOXY	〃	バリ島へ旅行
11	37・F	12. 10	SA,SM,TC,NA,ST,TMP,DOXY	〃	生カキによる事例(A家族)
12	44・M	12. 13	SA,SM,TC,NA,ST,TMP,DOXY	保菌者	〃
13	87・F	12. 14	SA,SM,TC,NA,ST,TMP,DOXY	〃	〃
14	25・M	12. 15	SA,SM,TC,NA,ST,TMP,DOXY	患者	生カキ喫食不明(B家族)
15	66・M	12. 19	SA,SM,TC,NA,ST,TMP,DOXY	〃	生カキによる事例(C家族)

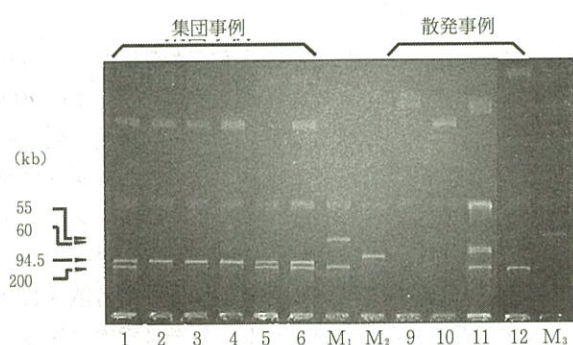


図1 集団事例と散发事例のプラスミドプロファイル  
 レーン1: 菌株 No. 3 レーン 9: 菌株 No. 1 M<sub>1</sub>: S.Enteritidis L156(60.200kb)  
 レーン2: 菌株 No. 4 レーン10: 菌株 No. 2 M<sub>2</sub>: E.coli W677 (94.5kb)  
 レーン3: 菌株 No. 5 レーン11: 菌株 No. 9 M<sub>3</sub>: E.coli W517 (55kb)  
 レーン4: 菌株 No. 6 レーン12: 菌株 No.10  
 レーン5: 菌株 No. 7  
 レーン6: 菌株 No. 8

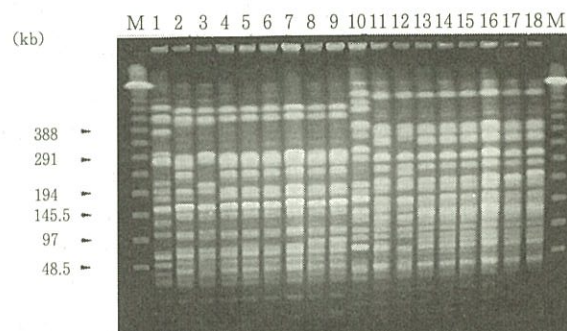


図2 家族内集団事例および散发事例由来株の PFGE パターン  
 レーン 1, 10: 1990 年分離株 レーン M : Lambda ladder  
 レーン 2, 11: 菌株 No. 1 レーン 1~9 : 制限酵素 Xba I  
 レーン 3, 12: 菌株 No. 2 レーン 10~18: 制限酵素 Bln I  
 レーン 4, 13: 菌株 No. 3  
 レーン 5, 14: 菌株 No. 4  
 レーン 6, 15: 菌株 No. 5  
 レーン 7, 16: 菌株 No. 6  
 レーン 8, 17: 菌株 No. 7  
 レーン 9, 18: 菌株 No. 8

図1 集団事例と散发事例のプラスミドプロファイル

図2 家族内集団事例および散发事例由来株の PFGE パターン

たところ、親戚関係にある1家族3名からも赤痢菌が分離された。疫学調査により感染者5名が共通して接触した機会として6月17日の法事があげられ、法事出席者の検便を実施したところ、さらに親戚1名から赤痢菌が分離された。計3家族6名から赤痢菌が分離されたが患者以外は検便時に症状はなく、無症状保菌者であった。感染者に保育園児2名、小学生1名が含まれていたため、保育園の園児と職員、小学校の所属学年の児童と教師計286名の検便も行ったが赤痢菌は分離されなかった。また、法事の検食はなく、感染者の国内外旅行歴もないため、原因は不明であった。

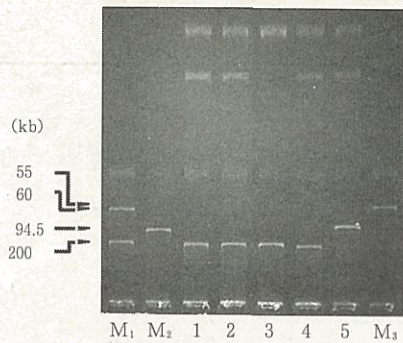
表1の菌株No.3~8に示したとおり、患者および保菌者から分離された6株はすべてソルネ赤痢菌であり、薬剤感受性試験の結果、6株すべてがSA,SM,TC,NA,ST,TMP,DOXY耐性株であった。6株のプラス

ミドプロファイルは、約130kbプラスミドを共通に保有していた(図1)。菌株No.3,7,8は同時に約190kbプラスミドを保有していた。制限酵素XbaI, BlnIを用いてPFGE法を実施した結果、6株すべてが同一パターンを示した(図2)。以上の結果から、同一感染源による家族内集団事例であることが推定された。

## 2) 生カキが原因食品として考えられた集団事例

2001年11月上旬から全国的に赤痢患者が多発し、その原因食品と考えられた韓国産生カキから患者と同じDNAパターンを示す赤痢菌が分離され、12月28日、厚生労働省は韓国産生カキの輸入を禁止した。

表1の菌株No.11~15に示したとおり、県内においても12月5日から14日にかけて、3家族5名の赤痢菌感染者が発生した。3家族のうち、A家族は生カキ喫



レーン1: 菌株 No.11 M<sub>1</sub>: *S. Enteritidis* L156(60.200kb)  
 レーン2: 菌株 No.12 M<sub>2</sub>: *E. coli* W677 (94.5kb)  
 レーン3: 菌株 No.13 M<sub>3</sub>: *E. coli* W517 (55kb)  
 レーン4: 菌株 No.14  
 レーン5: 菌株 No.15

図3 生カキが原因食品と疑われた集団事例の  
 プラスミドプロファイル

食者3名中患者1名、無症状保菌者2名であった。B家族は生カキ喫食者3名中すべて糞便検査において赤痢菌は陰性で、患者は喫食不明であった。C家族は生カキ喫食者2名中患者1名、赤痢菌陰性者1名であった。管内の保健所の疫学調査により3家族間に接触はなく、5名中4名の感染者は共通食として生カキを喫食していたことが判明した。

分離された5株はすべてソルネ赤痢菌であり、薬剤感受性試験の結果、SA, SM, TC, NA, ST, TMP, DOXYの7剤に耐性を示した。5株のプラスミドプロファイルを図3に示した。5株のうち3株は約200kbのプラスミドDNAを、1株は200kb以上のプラスミドDNAを、1株は約80kbのプラスミドDNAを、それぞれ保有していた。プラスミドDNAは、菌株の長期保存や継代培養を繰り返すことにより脱落することがあり、今回の集団事例においても何らかの理由により脱落し、菌株によって保有するプラスミドが異なった可能性が考えられた。制限酵素 *Xba*I, *Bln*I を用いて PFGE 法を実施した結果、菌株 No.12 で1本のバンドの違いがみられたが、残りの4株はすべて同一パターンを示した(図4)。国立感染症研究所に菌株を送付し、全国の分離株との比較を依頼したところ、韓国産生カキ由来株および全国で分離された患者由来株と同一のDNAパターン(typeA)を示したとのことであった。以上の結果から、県内で12月5日から14日にかけて発生した生カキ喫食不明の1名を含む3家族5名の赤痢感染者は生カキを原因食品とした同一の赤痢菌による集団事例であったことが推察された。

### 3) その他の散発事例

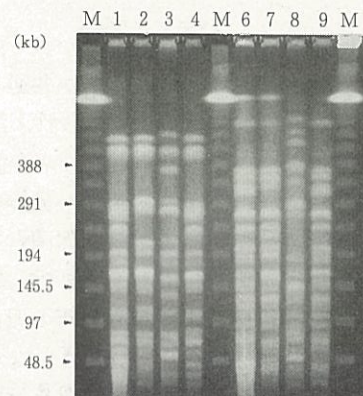
1), 2) に含まれない散発事例は表1の菌株 No.1, 2, 9, 10の4事例あり、発生時期は4月, 5月, 8月,



レーン1,10: 菌株 No.10 レーンM : Lambda ladder  
 レーン2,11: 菌株 No.2 レーン1~9 : 制限酵素 *Xba*I  
 レーン3,12: 菌株 No.3 レーン10~18: 制限酵素 *Bln*I  
 レーン4,13: 菌株 No.7  
 レーン5,14: 菌株 No.11  
 レーン6,15: 菌株 No.12  
 レーン7,16: 菌株 No.13  
 レーン8,17: 菌株 No.14  
 レーン9,18: 菌株 No.15

図4 生カキが原因食品と疑われた集団事例および  
 散発事例由来株の PFGE パターン

10月であった。4事例のうち海外で感染したと思われる輸入事例は3事例であった。表1の菌株 No.1の事例はタイのバンコクに旅行し、旅行中から水様性下痢の症状を呈し、帰国後1週間ほど症状が続いたため病院に受診し感染が判明した。菌株 No.2の事例は、インドに旅行し帰国後、旅行同行者から赤痢菌が分離されたため、管内保健所で糞便検査をしたところ赤痢菌が分離された無症状保菌者である。菌株 No.9の事例は管内の保健所による疫学調査、接触者の糞便検査を行ったが感染源不明の国内散発事例であった。菌株 No.10の事例はインドネシアのバリ島に旅行し、帰国後発熱、下痢等の症状を呈したため、病院に受診し赤痢菌が分離された事例である。海外旅行者による輸入事例の推定感染地はアジアが多く、その中でもインド、インドネシア、タイが上位を占めていることが報告<sup>6)</sup>されている。今回県内で発生



レーン1,6: 菌株 No.10 レーンM : Lambda ladder  
 レーン2,7: 菌株 No.2 レーン1~4 : 制限酵素 *Xba*I  
 レーン3,8: 菌株 No.3 レーン6~9 : 制限酵素 *Bln*I  
 レーン4,9: 菌株 No.7

図5 散発事例由来株の PFGE パターン

した輸入事例の推定感染地は、この報告にある上位3カ国と同じ感染地であった。

4事例から分離された4株は、すべてソクネ赤痢菌であり、薬剤感受性試験の結果、表1に示すとおり3～7剤に耐性を示した。4株のプラスミドプロファイルを図1に示した。菌株No.9は、約78,85,200kbのプラスミドDNAを、菌株No.10は、約200kbのプラスミドDNAを単独で保有し、菌株No.1,2はプラスミドDNAがみられなかった。制限酵素 *Xba*I, *Bln*I を用いてPFGE法を実施した結果、家族内事例や生カキを原因食品とする事例とは異なるDNAパターンを示した(図2,4)。さらに4菌株間でもDNAパターンは異なった(図5)。このことから、この4事例の株はそれぞれ別々の感染源由来の菌株であることが考えられた。

近年赤痢菌による感染症は、国内感染事例は減少したが海外旅行者が国内に持ち込む輸入事例が増加し、全体的な患者数は変化が少ない。また、今回輸入食品を原因とする全国的な散発事例(diffuse outbreak)があったが、輸入レタスを原因食品とするソクネ赤痢菌の集団事例の報告<sup>7)</sup>もあり、今後も同様の事例が発生する可能性があると考ええる。以上のことから、赤痢は依然として注目すべき感染症であり、海外での発生動向、薬剤への耐性化等これからも注目、監視する必要がある。

## ま と め

2001年4月から2002年3月までの1年間に県内で発生した赤痢について検討した結果、分離株数は計15株であり、すべてソクネ赤痢菌であった。疫学調査、分離菌株の性状検査の結果から、6月に発生した吉田保健所管内の6株と、12月に発生した生カキが原因食品として疑われた5株はそれぞれ同一感染源による集団事例である可能性が示唆された。他の4株は、疫学調査および検査結果から、それぞれ別々の感染源による散発事例と考えられた。

## 文 献

- 1) 金子通治ら：山梨衛公研年報，34，25～30（1990）
- 2) 山梨県厚生部：忍野村赤痢集団発生に係る調査報告書，1991年2月
- 3) 厚生省監修：微生物検査必携細菌・真菌検査，第3版，D14～D29 日本公衆衛生協会，東京（1981）
- 4) Kado,C.I.&Liu,S.T.：J.Bacteriol. 145，1365～1373（1981）
- 5) 和田昭仁ら：腸管出血性大腸菌O157の検出・解析等の技術研修会テキスト，17～31（1997）
- 6) 国立感染症研究所：病原微生物検出情報，22，81～86（2001）
- 7) Kapperud,G.et al：J.Clin.Microbiol. 33，609～614（1995）