

## **(2) 調査・事例**

---

- 1) 蒲江町沿岸における二枚貝の麻痺性貝毒について……………43
- 2) 健康人由来大腸菌における病原性関連遺伝子の保有状況調査……………47
- 3) 大分県における小児及び健康成人の髄膜炎菌等の保菌実態調査……………53

## 蒲江町沿岸における二枚貝の麻痺性貝毒について

森崎澄江、荒金真理子、立花敏弘、濱内正博

### Paralytic Shellfish Poisons in Bivalves Collected at the Coast of Kamae Townn (1997—2002)

Sumie Morisaki, Mariko Arakane, Toshihiro Tachibana, Masahiro Hamauchi

Key words : 麻痺性貝毒 PSP、ひおうぎ貝 *Chlamys nobilis*、*G. catenatum*、*A. catenera*

#### 要旨

本県南部の蒲江町の沿岸部において養殖されているひおうぎ貝の麻痺性貝毒モニタリング調査の結果、毒力が20MU/gを超えた回数は1997年度～1999年度の3年間では2回で、いずれも翌週の毒量は低下したのに対し、2000年度～2002年度の3年間は14回で、2週以上高い毒量を持続したのが6回あり、近年麻痺性貝毒の発生頻度が高まる傾向にあった。

原因プランクトンである *G. catenatum* と *A. catenera* の発生状況は1996年4月から6月に両者とも高密度に発生して以来1998年度末までは検出される頻度は少なかったが、1999年に2月に *G. catenatum* が高密度で発生して以来、比較的高い頻度で発生しており、*G. catenatum* の方が *A. catenera* より密度、回数とも多い傾向を示している。

#### はじめに

本県では、県南部の蒲江町の沿岸部においてひおうぎ貝の養殖が行われているが、昭和50年代からこの近郊では麻痺性貝毒原因プランクトンの *A. catenella* や *G. catenatum* の発生が認められており貝毒モニタリング調査を行ってきたが、近年ひおうぎ貝の麻痺性貝毒量が高くなる傾向を示し漁業への影響がみられるようになった。

このため、大分県では平成13年10月に「大分県貝毒被害防止対策マニュアル」を策定し、年間をとおして計画的に海水状況、プランクトン発生状況及び貝毒のモニタリング調査を実施し、毒化の予測や採捕、出荷等の管理を行い食品の安全確保に努めている。

当センターはこの事業において麻痺性貝毒の毒力検査を担当していることからモニタリング調査の結果を取りまとめたので概要を報告する。

#### 試料及び検査方法

##### 1 試料

大分県蒲江町小蒲江湾で養殖したひおうぎ貝を海洋水産研究センターがサンプリング計画に基づいて採取、冷凍輸送された中腸腺を解凍後分析した。

##### 2 検査方法

「貝毒の検査方法」(昭和55年7月1日付け厚生労働省通知)に準じた大分県検査実施標準作業書に基づきマウスを用いた動物試験により行った。

毒力20MU/g以上の場合は独力の推移を確認するためマニュアルに従い次週も中腸腺の検査を行った。また、毒力40MU/g以上の場合は翌週にひおうぎ貝可食部の検査を行った。

##### 3 調査期間

1997年から2002年度を調査期間とした。

表1 1997年度~2002年度 ヒオウギガイ麻痺性貝毒モニタリング結果 (中腸腺)

1997年度

	毒量 MU/g	プランクトン(最大数)*1	
		<i>G. catena</i> .*2	<i>A. catene</i> .*3
1997/4/7	2.8	0	0
1997/4/21	3.1	0	20
1997/5/6	5.4	0	0
1997/5/19	8.7	0	20
1997/6/2	8.4	0	40
1997/6/16	13	0	30
1997/7/1	6.0	0	0
1997/7/22	9.0	0	0
1997/8/14	10.4	0	0
1997/9/9	9.6	27	0
1997/10/4	5.1	0	20
1997/11/17	8.2	0	10
1997/12/5	6.6	0	0
1997/12/22	2.7	0	0
1998/1/6	3.3	0	0
1998/1/19	4.5	0	0
1998/2/2	2.8	0	0
1998/2/23	2.8	0	0
1998/3/2	3.0	0	0
1998/3/16	3.2		0

1998年度

1998/4/6	3.3	0	0
1998/4/20	3.4	20	20
1998/5/1	3.8	60	20
1998/5/18	6.2	40	0
1998/6/1	4.5	0	0
1998/6/15	8.7		
1998/6/29	6	0	160
1998/7/21	5.4	0	0
1998/8/3	4.5	70	0
1998/9/7	2.4	0	0
1998/10/12	2.6	0	0
1998/11/9	3.2	0	80
1998/11/24	2.7	0	30
1998/11/30	2.6	0	0
1998/12/11	3.8	0	60
1999/1/18	4.6	23	0
1999/2/1	5.6	33	0
1999/2/22	7.3	267	0
1999/3/5	24.0	320	0
1999/3/15	13.9	0	0
1999/3/23	11.1	13	0
1999/3/29	12.1	67	0

1999年度

1999/4/5	9.8	200	0
1999/4/19	10.6	0	5
1999/5/10	10.1		0
1999/5/24	13.0	63	20
1999/6/8	18.8	160	45
1999/6/21	13.7		
1999/6/28		57	7
1999/8/2	13.7		0
1999/9/6	13.2	77	0
1999/10/12	15.7	0	0
1999/11/8	10	27	0
1999/11/29	6.5	11	0
1999/12/13	16.8	82	0
2000/1/11	33.8	0	0
2000/1/17	12.9	0	0
2000/1/24	13.7	26	0
2000/2/14	10.1	0	0
2000/2/21	15.5	0	0
2000/3/6	10.4	11	0
2000/3/21	9.8	22	0

2000年度

	毒量 MU/g	プランクトン(最大数)*1	
		<i>G. catena</i> .*2	<i>A. catene</i> .*3
2000/4/3	11.9	100	13
2000/4/10		267	0
2000/4/17	24.0		
2000/4/24	26.9	203	0
2000/5/1	30.9		
2000/5/8	41.0	66	0
2000/5/15	31.0	100	43
2000/5/22	27.4	13	0
2000/5/29	30.2	40	33
2000/6/5	21.8	0	0
2000/6/12	19.3	70	40
2000/6/19	27.0	0	0
2000/6/26	14.9	0	23
2000/7/3	16.9	0	0
2000/8/7	20.0	40	0
2000/9/4	32.8	53	0
2000/9/11	26.9		
2000/9/19	31.0	13	0
2000/9/26	29.9	72	60
2000/10/2	12.7	26	0
2000/10/30	10.7	0	0
2000/11/13	12.5	103	0
2000/11/27	7.8	0	0
2000/12/11	9.4	40	0
2000/12/18	9.6	13	0
2000/12/25	10.1	0	0
2001/1/9	23.6	0	53
2001/1/15	38.6	7	13
2001/1/22	20.7	0	7
2001/2/5	23.7	26	0
2001/2/19	16.4	0	0
2001/3/6	15.5	0	0
2001/3/19	38.8	0	0
2001/3/27	12.0	36.7	0

2001年度

	毒量 MU/g	プランクトン(最大数)*1	
		<i>G. catena</i> .*2	<i>A. catene</i> .*3
2001/4/9	10.5	163	3
2001/4/17		490	20
2001/4/23	15.3	190	53
2001/5/2	23.5	137	66
2001/5/8	20.5	0	0
2001/5/14	24.9	0	150
2001/5/21	26.6		
2001/5/28	21.5	36.7	0
2001/6/11	20.3	0	0
2001/6/25	11.1		
2001/7/9	12.2	0	0
2001/8/6	6.5	53	0
2001/9/3	3.2	0	0
2001/10/15	3.4	0	0
2001/10/29	3.3	0	0
2001/11/12	6.5	57	0
2001/11/26	6.2	26	0
2001/12/10	22.5	33.3	0
2001/12/17	16.6	0	0
2002/1/15	18.0	0	0
2002/1/28	17.2	49.2	
2002/2/12	20.5	20	
2002/2/19	14.4	40	
2002/2/25	22.6	210	0
2002/3/4	19.2		
2002/3/10	22.4	2766	0

2002年度

	毒量 MU/g	プランクトン(最大数)*1	
		<i>G. catena</i> .*2	<i>A. catene</i> .*3
2002/4/8	10.4	170	
2002/4/22	11.5	0	
2002/5/13	40.4	0	14000
2002/5/22	33.0	0	4000
2002/5/27	21.4	0	30
2002/6/10	19.3	0	20
2002/6/24	63.4	0	0
2002/7/1	14.2	0	0
2002/7/8	13.0	26	26
2002/7/22	21.0	913	0
2002/7/30	20.3	23.0	0
2002/8/5	11.4	20	0
2002/9/5	15.7	0	0
2002/10/7	16.6	0	0
2002/10/28	7.6	30	0
2002/11/13	7.6	50	0
2002/11/25	8.3	100	0
2002/12/9	8.5	60	0
2002/12/16	5.0	0	0
2003/1/8	6.4	50	0
2003/1/27	4.7	43	0
2003/2/3	6.9	132	0
2003/2/24	11.2	63	0
2003/3/3	18.4	173	0
2003/3/24	22.1	410	0
2003/3/31	17.1	1430	0

\*1 測定点5層のうち最も多く出現した層の出現数 cells/l

\*2 *Gymnodium catenatum*

\*3 *Alexandrium catenella*

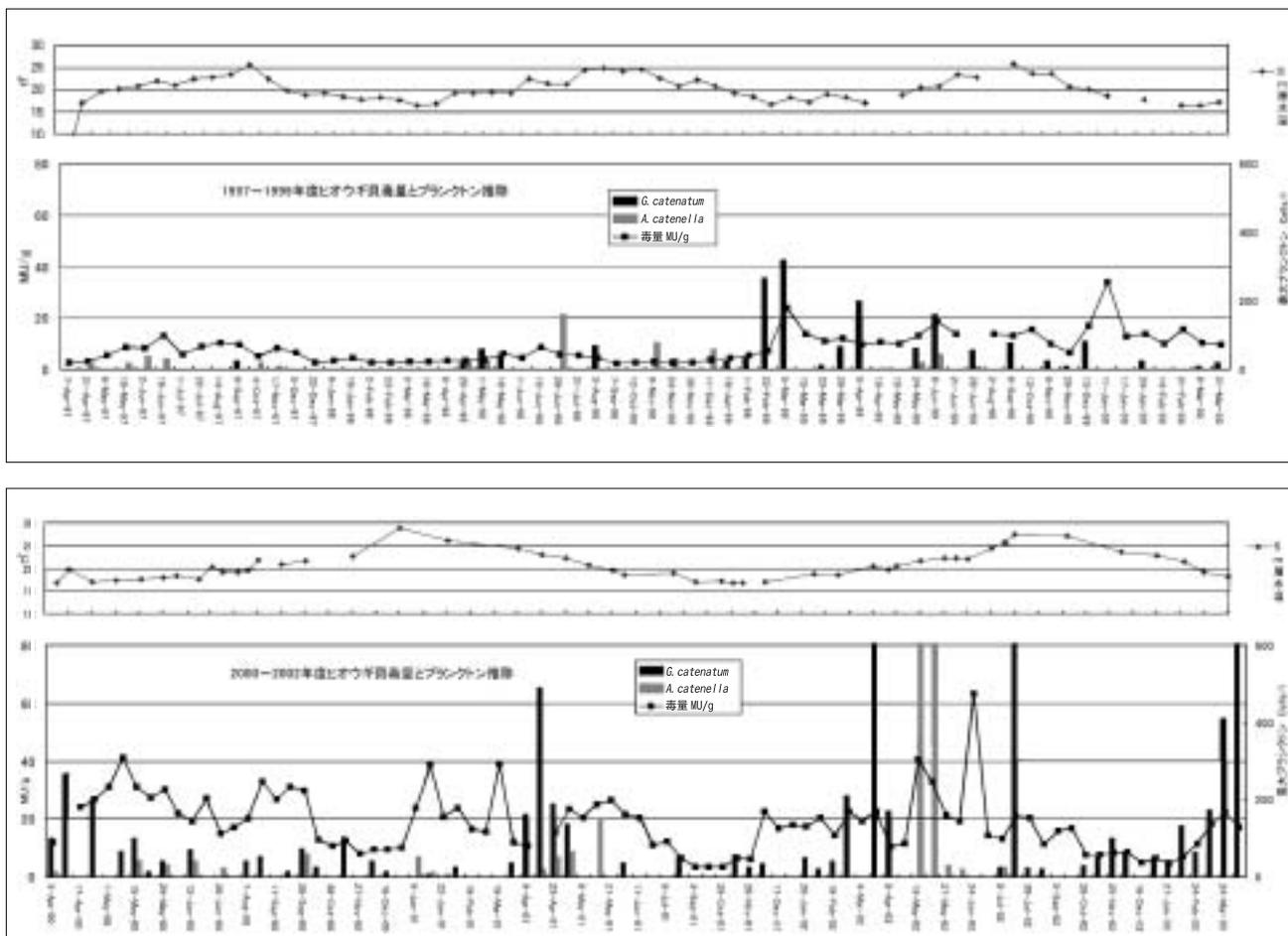


図1 ひおうぎ貝中腸線麻痺性貝毒及びプランクトン発生状況

結果及び考察

1 毒量検査結果

6年間のモニタリング結果を図1に示した。

「大分県貝毒被害防止対策マニュアル」ではひおうぎ貝の中腸線の毒量が20MU/g 以上の場合、警戒体制強化として計画外の中腸線検査を翌週も行い対応することになっているが、表1に示したようにこの6年間に20MU/g 以上であったのは1997年度～1999年度の間で2回でいずれも翌週の毒量は低下した。これに対して2000年度～2002年度の間には14回で、このうち2週以上高い毒量を持続した期間が6回あり、4月から6月にかけての毒化時期は20MU/g 以上が継続してみられた。

また、40MU/g 以上の毒量が2002年5月13日と6月24日の2回あったがいずれも翌週検査でひおうぎ貝の可食部毒量が食品衛生法の基準4MU/g を超えることはなかった。

全期間をとおしてみると、1999年2月までの平常

毒量は10MU/g 未満で推移していたが3月初旬に20MU/g を超える毒量を検出して以来平常時の毒力が10MU/g 未満になることは少なくなった。

2 原因プランクトン発生状況調査結果

麻痺性貝毒原因プランクトンの *G. catenatum* と *A. catenella* の状況は1996年4月から6月にかけてそれぞれ最高630cells/l、346cells/l と高密度に発生し<sup>2)</sup>、ひおうぎ貝の毒量上昇を引き起こしたものの1998年度末までは検出される頻度が少なかった。しかし、1999年に2月に *G. catenatum* が320cells/l 発生して以来、比較的高い頻度で発生するようになり、その種は *G. catenatum* の方が *A. catenella* より密度、回数とも多く、過去の調査<sup>1), 2)</sup> においてはプランクトン発生期は冬から春にかけての水温20℃以下の時期であったのに対し、2002年は5月から7月の水温が20℃を超える時期にも *G. catenatum*、*A. catenella* の双方が高密度に発生し、ひおうぎ貝の毒量も期間中で最も高い値となったことが特徴的であった。

以上の毒量検査結果及びプランクトン発生状況調査結果から、蒲江町のひおうぎ貝養殖場の周辺海域では、年間を通して貝毒原因プランクトンの高密度発生及び高毒化の可能性が懸念され、安全な食品の供給のためにも継続的モニタリング調査の必要性が確認された。

### ま と め

- (1) 1997年度から2002年度6年間にひおうぎ貝中腸線の麻痺性貝毒が20MU / g以上であったのは、1997年度～1999年度の間に2回でいずれも翌週の毒量は低下した。2000年度～2002年度の間には14回で、このうち2週以上高い毒量を持続したのが6回あった。
- (2) 1999年2月までの平常毒量は10MU / g未満で推移していたが3月初旬に20MU / gを超える毒量を検出して以来平常時の毒力が10MU / g未満になることは少なくなった。
- (3) 麻痺性貝毒原因プランクトンである *G. catenatum* と *A. catenera* の発生状況は1996年4月から6月にかけて両者とも高密度に発生し<sup>2)</sup>、ひおうぎ貝の毒量上昇を伴ったものの1998年度末までは検出される頻度は少なかった。1999年に2月に *G. catenatum* が高密度で発生して以来、比

較的高い頻度で発生し、*G. catenatum* の方が *A. catenera* より密度、回数とも多かった。

- (4) 過去のプランクトン高密度発生時が冬から春にかけての水温20℃以下の時期であったのに対し<sup>1), 2)</sup>、2002年は5月から7月の水温が20℃を超える時期にも *G. catenatum*、*A. catenera* の両プランクトンが高密度に発生したことが特徴的であった。
- (5) 本調査結果から、蒲江町のひおうぎ貝養殖場の周辺海域では、年間を通じて貝毒原因プランクトンの高密度発生及び高毒化の可能性が懸念された。

### 謝 辞

本報告にあたりご協力をいただきました大分県海洋水産研究センターの宮村研究員に謝意を表します。

### 文 献

- 1) 局伸男他：貝毒モニタリング結果について，大分県衛生環境研究センター所報，第20号（1992）
- 2) 後藤成一他：蒲江町沿岸海域における二枚貝の麻痺性貝毒について，大分県衛生環境研究センター所報，第24号（1996）

## 健康人由来大腸菌における病原性関連遺伝子の保有状況調査

成松浩志、緒方喜久代、鷲見悦子、帆足喜久雄

### Investigation of *Escherichia coli* in Feces from Healthy Human Beings and the Incidence of Pathogenesis-related Genes of the Isolates

Hiroshi Narimatsu, Kikuyo Ogata, Etsuko Washimi, Kikuo Hoashi

Key words : 大腸菌 *E. coli*, *eaeA*, *aggR*

#### 要旨

前年度に、病原血清型大腸菌 (EPEC) 及び腸管凝集付着性大腸菌 (EAggEC) の病原性関連遺伝子と考えられている *eaeA*, *bfpA*, *aggR*, *astA* 等について、PCR 法を用いて下痢症患者由来大腸菌における保有状況調査を実施したので、今年度は健康者100名を対象に同様な調査を実施し病原性関連遺伝子保有率の統計的比較を試みた。

健康者便100検体中97検体から157株の大腸菌が検出された。このうち、VTEC、ETEC、EIEC は検出されなかったが、*eaeA* 保有大腸菌が6検体 (6%)、*aggR* 保有大腸菌が3検体 (3%)、*astA* 保有大腸菌が12検体 (12%)、*bfpA* 保有大腸菌が1検体 (1%) から検出された (重複保有あり)。これら病原性関連遺伝子保有大腸菌の検出率を昨年度調査した下痢症患者のそれとフィッシャーの正確確率検定を用いて比較検定したところ統計的有意差はなかった ( $p > 0.05$ )。

分離された大腸菌157株の大腸菌のうちO血清型別できた64株中、高頻度検出血清型はO1で18株 (28%)、次いでO18が6株 (9%) であった。これらの内、*astA* 遺伝子が検出された1株のO1を除いて、他のすべてのO1とO18から病原性関連遺伝子は検出されなかった。一方、市販血清でO血清型別不能 (OUT) 株やOR株は65検体から93株で、この内11株 (12%) がなんらかの病原性関連遺伝子を保有していた。

以上から、病原性関連遺伝子検査や血清型別検査のみを根拠に食中毒事件の原因物質を断定することの危険性が示唆された。

#### はじめに

下痢原性大腸菌<sup>1)</sup>の中でも EPEC<sup>2)</sup> や EAggEC<sup>4)</sup> については、いまだ真の病原因子が明らかにされていないため、細胞付着試験等の煩雑で判定に熟練を要する手法やときには病原性発現確認 (ボランティア人体実験) によって調査せざるを得なかったが、近年、その病原性に関連していると思われる遺伝子 (*eaeA*, *bfpA*, *aggR*, *astA*) を標的にした PCR 法を用いてスクリーニングができるようになった。散発下痢症由来大腸菌については、PCR 法による病原性関連遺伝子の保有状況調査<sup>3, 5, 6)</sup> がなされてきており、加藤ら<sup>5)</sup> は、*eaeA* あるいは *aggR* 保有大腸菌は乳幼児下痢症においてロタウイルスとともに極めて重要な病原体と位置づけている。しかしながら、これらの

病原性関連遺伝子は下痢症を起すに必要な因子であるかもしれないが十分な因子 (病原因子) ではない。下痢症患者由来大腸菌におけるこれら病原性関連遺伝子の保有の意味を正しく評価するためには、健康者におけるそれらの分布調査を行い、バックグランドデータを蓄積して統計的に比較検討する必要がある。森屋ら<sup>6)</sup> は散発下痢症患者及び健常乳幼児由来大腸菌の病原性関連遺伝子の保有率を比較し統計的に検討した結果、健常者群よりも下痢症患者群が相対的に高い傾向にあるものの有意な差が認められなかったと報告しているが、対象が集団保育されている乳幼児だったので、不顕性感染でバックグランドが高めにでている可能性もある。また、EPEC や EAggEC は必ずしも乳幼児に限定して感染するわけではないので、乳幼児以外の健康者から分離された大腸菌の病原性関連遺伝子保有率も把握し、乳幼児

群由来のそれと比較する必要もある。一方、倉園ら<sup>7)</sup>は、一般の健康者糞便4667検体から分離された大腸菌のうち市販血清で型別された439株について病原性関連遺伝子の保有状況を調査し、33株(7.6%)の *eaeA* 保有大腸菌と26株(6%)の *aggR* 保有大腸菌を検出したと報告しているが、市販血清で型別されなかった(OUT)株について調べられていない。

そこで、今回、乳幼児以外の一般健康者から分離され大腸菌における病原性関連遺伝子の保有状況を血清型にかかわらず調査し、バックグランドデータを得ることにした。

また、ヒトから分離されるVTECのほとんどはエンテロヘモリジン(Ehly)を産生するとされ<sup>8)</sup>、近年、Ehlyを指標としたVTECのスクリーニング法<sup>9)</sup>が検討されているが、一般健康者から分離されるVTEC以外の大腸菌のEhlyバックグランドについてはあまり調査されていない。そこで、健康者由来大腸菌におけるEhlyの分布と病原性関連遺伝子との相関についても調べることにした。

## 方 法

2002年7月から同年10月にかけて、主に大分市とその周辺地域で採取された健康(親告)者100名の糞便を検体とした。検査対象者の職業は、給食調理従事者が73名、学生・会社員等27名であった。糞便を滅菌綿棒で約0.1g採り滅菌リン酸緩衝生理食塩水(PBS)1mlに攪拌混和後、Tryptic soy broth(DIFCO社製、以下TSB)4mlに3~4滴接種し、37℃で一夜振とう培養した。この培養液1mlから遠心分離によって集菌した菌体を滅菌蒸留水で1回洗浄後、煮沸法によってテンプレート液を調製し、PCR法で *eaeA*、*bfpA*、*aggR*、*astA* の各遺伝子を検索した。PCRスクリーニングは、*eaeA* と *bfpA*、*aggR* と *astA* の2通りの組合せで混合プライマー法を実施した。テンプレート5 $\mu$ lを含む全量50 $\mu$ lの反応液中、プライマー最終濃度は、*eaeA* と *bfpA* では、*eaek1* と *EA-2* を各0.75 $\mu$ M、*bfps* と *bfpas* を各0.15 $\mu$ Mとし、*aggR* と *astA* では、*aggRkas1* と *aggRkas2* を各0.75 $\mu$ M、*EAST01* と *EAST02* を各0.15 $\mu$ Mとした。緩衝液と基質はTaKaRa Ex-Taq(宝酒造)添付品を添付文書の処方に従って添加した。陽性コントロールとして *eaeA* と *bfpA* はE2348株を、*aggR* と *astA* は17-2株を使用した。サーマルサイクラーは、MJリサーチ社製PTC-225を使用し、反応条件は、カリキュレート方式

で、94℃2分の前加熱の後に、94℃5秒、55℃5秒、72℃10秒のサイクルを30回とした。増幅されるDNAサイズは、*eaeA* 591bp、*bfpA* 234bp、*aggR* 254bp、*astA* 109bpである。PCR反応産物はエチジウムブロミド入り2%アガロースゲル(E-Gel、Invitrogen社製)で電気泳動し、トランスイルミネーター上で観察した。

また、同じテンプレート液を試料として、PCR法<sup>10)</sup>でVTECのペロ毒素(VT)遺伝子、毒素原性大腸菌(ETEC)の易熱性エンテロトキシン(LT)と耐熱性エンテロトキシン(ST)の各遺伝子、腸管組織侵入性大腸菌(EIEC)の侵入性遺伝子(*invE*)の検索も実施した。

これと平行して、上記の糞便混和液1滴をDHL寒天培地(栄研、以下DHL)に画線塗沫し、36℃で24時間分離培養した。

PCRスクリーニングで標的遺伝子が検出された場合、DHLに発育したコロニーの中から大腸菌が疑われるものを5~30個釣菌し、それぞれを普通寒天平板(栄研社製)に接種・培養後、PCR法で当該遺伝子の保有の有無を調べた。大腸菌の分離同定は常法に従った。同定には、TSI培地(栄研社製)、LIM培地(栄研社製)、シモンズクエン酸斜面培地(栄研社製)、XM-ブロス(エルメックス社製)、IDテストEB-20(日水社製)、チトクロームオキシダーゼ試験用ろ紙(日水社製)を用いた。O血清型別は病原大腸菌免疫血清1号セット(デンカ生研社製)を用い、スライド凝集法で行った。このセットで型別不能のものをOUTとし、自家凝集株はORとした。

上記分離菌株について、エンテロヘモリジン血液寒天培地(関東化学社製)に接種し、36℃で3から4時間培養後、24時間培養後、48時間培養後の溶血環を観察してEhly産生を確認した。

統計的有意差の検討は、フィッシャーの正確確率検定(Fisher's exact test)にて、有意水準5%( $p < 0.05$ )で判定した。

## 結 果

13才から67才までの健康者100名(男21名、女79名)の糞便をPCR法でスクリーニング検査したところ、病原遺伝子(VT、ST、LT、*invE* 遺伝子)は全検体で陰性であったが、*eaeA* が7検体(7%)、*bfpA* が3検体(3%)、*aggR* が3検体(3%)、*astA* が16検体(16%)で陽性を示した(重複あり)。

これら病原性関連遺伝子保有大腸菌の分離を実施

表1 検体の年齢別分布と病原性関連遺伝子保有大腸菌の検出状況

年齢	女	男	計	<i>eaeA</i>	<i>eaeA+bfpA</i> + <i>astA</i>	<i>astA</i>	<i>aggR</i>	<i>aggR</i> + <i>astA</i>
10~19		2	2					
20~29	21	6	27	1		2	2	
30~39	19	1	20		1	2		1
40~49	18	5	23	1		2		
50~59	19	7	26	3		3		
60~70	2		2			1		
計	79	21	100	5	1	10	2	1

した結果、*eaeA* 単独保有大腸菌が5名から5株（いずれもOUT）、*eaeA*・*bfpA*・*astA* 保有大腸菌が1名から1株（O153）、*aggR* 単独保有大腸菌が2名から2株（O25とOUT）、*aggR*・*astA* 保有大腸菌が1名から1株（O44）、*astA* 単独保有大腸菌が10名から10株（O1、O25、O146が各1株、O159が2株、OUTが5株）検出された。（表1参照）

分離された大腸菌総株数は100名中97名から157株で、O血清型別されたのは52名から21種類64株（40.8%）であった。最も検出頻度が高い血清型はO1で18株（11.5%）、次いでO18の6株（3.8%）であったが、この中で病原性関連遺伝子を保有していたのは、1株のO1だけだった。*aggR* 保有大腸菌3株中2株は血清型別されたが、*eaeA* 保有大腸菌6株中5株はOUTであった。いずれかの病原性関連遺伝子が陽性であった大腸菌株が、全分離株に占める割合は12.1%（19/157）、血清型別された大腸菌株に占める割合は12.5%（8/64）、OUT等血清型別できなかった大腸菌株に占める割合は11.8%（11/93）であり、血清型による有意な差は認められなかった。

Ehly は、157株中46株（29.3%）に認められた。病原性関連遺伝子保有株の Ehly 陰性株に占める割合は8.1%（9/111）であったが、Ehly 陽性株に占める割合は21.7%（10/46）と有意な差を認めた。とりわけ*eaeA* 保有株については、Ehly 陰性株に占める割合が1.8%（2/111）であったのに対して、Ehly 陽性株に占める割合は8.7%（4/46）と高い傾向にあった。（表2参照）

## 考 察

本結果と他調査報告における病原性関連遺伝子保有大腸菌検出率の統計的比較検討を試みた（表3参

照）。EPEC 及び EAggEC の関連遺伝子を検討するのが目的なので、VTEC 及び ETEC 検出例は除いた。*bfpA* は、他報においても検出率が低く、統計的な評価がなされていなかったもので、他報に準じて、*eaeA*、*aggR*、*astA* の検出率で比較した。1株で複数の検査対象遺伝子を保有しているものは、それぞれの遺伝子ごとに1ずつ計上した。比較対象は、佐賀県の健康乳幼児及び下痢症患者群<sup>6)</sup>、大分県の下痢症患者群<sup>11)</sup>、東京都多摩地区の下痢症患者群<sup>5)</sup>、そして、埼玉県健康者群<sup>7)</sup>である。比較項目は、各遺伝子保有大腸菌の総分離株数に占める割合及び血清型が判明した大腸菌中における割合、各遺伝子保有大腸菌が検出された人数の全検査人数に占める割合及び血清型の判明した大腸菌が検出された全人数中での割合とした。加藤らの報告<sup>5)</sup>では、*astA* が調査されておらず、倉園らの報告<sup>7)</sup>では市販血清で型別できた菌株だけしか遺伝子検索されていないなど、報告データの内容に差異もあるが、比較できる範囲で検討した。その結果、大分県健康者群と佐賀県下痢症乳幼児群における各病原性関連遺伝子検出率間にも統計的に有意な差が認められた。*eaeA* もしくは *aggR* 保有菌株の総分離株に占める割合、同じく血清型の判明した分離菌株に占める割合は、佐賀県下痢症乳幼児群の方が大分県健康者群より高い傾向にあった。*aggR* 保有大腸菌検出人数の全検査人数に占める割合、*eaeA* 保有大腸菌（血清型判明）検出人数の血清型判明大腸菌検出全人数に占める割合も同じく高い傾向が認められた。これ以外の群との差はいずれの項目でも認められなかった。

大分県の健康者群と佐賀県の健康乳幼児における各遺伝子保有大腸菌の比率に統計的有意差はなかったが、佐賀県健康乳幼児群がいずれの項目でも高い傾向にあった。このため、佐賀県の健康乳幼児群と

下痢症患者群には統計的有意差が認められなかったのではなかろうか。この高いバックグラウンドは、検査対象が5保育施設の園児に限られていたので、集団保育されている中で不顕性感染が広まっている可能性を示唆しているのかもしれない。検体の確保が困難ではあるが、集団保育されていない乳幼児を対象とした調査が望まれる。

しかしながら、病原性関連遺伝子保有大腸菌の検出率に健康者群と下痢症患者群の間で有意な差がほとんど認められなかったことは、これらの遺伝子検査だけで下痢症起因菌と判断することの危険性を示唆

している。健康者由来の病原性関連遺伝子保有大腸菌と下痢症由来との相違点を今回の調査ではあきらかにできなかったが、全ての下痢症由来株が真に起因菌であったかどうかは疑わしい。今後の課題として、EPECやEAggECの未知の病原因子を明らかにするためには、人体実験や疫学情報等で病原性が確かな菌株と健康者由来菌株との遺伝子配列等を含めた多角的な比較研究を実施し検討する必要があると考える。

健康者由来大腸菌の血清型については、病原性関連遺伝子との間に関連は認められなかった。O1や

表2 健康者由来大腸菌の血清型と病原性関連遺伝子及びエンテロヘモリシン検出状況

	Ehly (-)				Ehly (+)					Total	%
	Non	astA	eaeA	aggR	Non	astA	eaeA	aggR + astA	eaeA + bfpA + astA		
O1	7	1			2					10	6.4
O1:HNM	6				2					8	5.1
O6	2				1					3	1.9
O8	4				1					5	3.2
O15					1					1	0.6
O18	5				1					6	3.8
O20					2					2	1.3
O25	4	1		1						6	3.8
O44								1		1	0.6
O125	2									2	1.3
O126	2									2	1.3
O128	1									1	0.6
O146	1	1								2	1.3
O151					1					1	0.6
O152					1					1	0.6
O153	1				1				1	3	1.9
O159					1	2				3	1.9
O164	1				1					2	1.3
O166	2									2	1.3
O167	1									1	0.6
O167:HNM					1					1	0.6
O169	1									1	0.6
OR	5				2					7	4.5
OUT	57		2		18	3	3			83	52.9
OUT:HNM		2		1						3	1.9
Total	102	5	2	2	36	5	3	1	1	157	100.0
	111				46						
%	91.9	4.5	1.8	1.8	78.3	10.9	6.5	2.2	2.2		

O18 は古典的な EPEC 血清型の範疇に入っているとはいえ、他報<sup>6, 7)</sup>と同様に健康者から高率に分離され、また、病原性関連遺伝子の保有率はきわめて低かった。一方で、OUT の中に病原性関連遺伝子を保有している菌株は多数見出されており、血清型にとらわれることなく病原性を検討することの重要性が示唆された。他方、森屋ら<sup>6)</sup>は、下痢症由来大腸菌の古典的 EPEC 血清型の中でも、O55:H7 は *eaeA* を、O111:H21 は *aggR* と *astA* をよく保有し、しかも健康乳幼児からは分離されなかったと報告している。我々の調査した健康者の中からもこれらの血清型は分離されなかったが、大分県の散発下痢症由来大腸菌の中からは *aggR* 及び *astA* を保有する O111:H21、

O111:H41、O111:HNM を見出している<sup>11)</sup>。このような血清型の大腸菌は真に下痢症起因菌である可能性が考えられる。

Ehly について、木村ら<sup>9)</sup>は、健康人由来非 VTEC 菌株の10%と患者由来非 VTEC の12%が陽性を示すが、患者由来 VTEC では100%陽性を示した報告している。一方、本調査では非 VTEC 株であっても約3割が Ehly 陽性を示した。木村らは、Beutin 血液寒天培地を使用し、本調査ではエンテロヘモリジン血液寒天培地を使用しているため、感度の差があるかもしれない。VTEC や ETEC 及び EIEC 以外の下痢症患者由来大腸菌株における Ehly 陽性率は、我々の調査<sup>11)</sup>では31.5%であり、健康者由来株との間に有意な差は認められ

表3 他の報告との比較

報告者	本調査		森屋ら <sup>6)</sup>		成松ら <sup>11)</sup>		加藤ら <sup>5)</sup>		倉園ら <sup>7)</sup>			
調査年	2002		1999		2001		1999~2000		1997~1999			
調査地域	大分		佐賀県		大分		東京都多摩		埼玉県			
調査対象	健康者		健康乳幼児	下痢症患者	下痢症患者	下痢症患者	下痢症患者	健康者				
検体数 (人)	100		304	74	119	525	4667					
総分離株数	157	%	396	%	74	%	124	%	1546	%	ND	
<i>eaeA</i> (+) 株数	6	3.8	19	4.8	9	12.2	6	4.8	18	1.2		
<i>aggR</i> (+) 株数	3	1.9	10	2.5	10	13.5	2	1.6	11	0.7		
<i>astA</i> (+) 株数	12	7.6	29	7.3	10	13.5	10	8.1	NT			
血清型判明株数	64	%	107	%	74	%	53	%	ND		435	%
<i>eaeA</i> (+) 株数	1	1.6	6	5.6	9	12.2	2	3.8			33	7.6
<i>aggR</i> (+) 株数	2	3.1	6	5.6	10	13.5	1	1.9			26	6.0
<i>astA</i> (+) 株数	7	10.9	14	13.1	10	13.5	3	5.7			30	6.9
大腸菌分離人数	97	%	278	%	74	%	107	%	517	%	ND	
<i>eaeA</i> (+) 株数	6	6.2	17	6.1	9	12.2	6	5.6	18	3.5		
<i>aggR</i> (+) 株数	3	3.1	10	3.6	10	13.5	2	1.9	11	2.1		
<i>astA</i> (+) 株数	12	12.4	29	10.4	10	13.5	11	10.3	NT			
血清型分離人数	52	%	105	%	74	%	42	%	ND		425	%
<i>eaeA</i> (+) 株数	1	1.9	6	5.7	9	12.2	2	4.8			33	7.8
<i>aggR</i> (+) 株数	2	3.8	6	5.7	10	13.5	1	2.4			26	6.1
<i>astA</i> (+) 株数	7	13.5	14	13.3	10	13.5	3	7.1			30	7.1

1 株から複数の病原性関連遺伝子が検出された場合、それぞれの欄に計上した (重複あり)。

VTEC や ETEC の検出例・菌株数を除く。NT: 検査未実施 ND: データ記載なし

本調査と比較して統計的に有意な差がある項目は、 で表示した。

倉園らの報告には、各病原性関連遺伝子別検出人数が掲載されていないので、株数を人数とした。

ない。このことは、Ehly を指標とした VTEC 検索が、VTEC 感染症が濃厚に疑われる場合には効率的であるものの、健康保菌者検索や原因のはっきりしない下痢症ではあまり有効でないことを示唆している。

今回の調査で、Ehly 陽性菌株に占める病原性関連遺伝子保有菌株の割合 (21.7%) が Ehly 陰性株に占める割合 (8.1%) よりも有意に高かったことは興味深い現象であった。これには、特に *eaeA* 保有株の寄与が顕著であった。Ehly 遺伝子は VTEC の病原性プラスミド (pO157) 上に乗っている<sup>8)</sup>ので、逆に Ehly を指標として病原性プラスミドの存在を推定できる。Ehly は、非 VTEC においても何らかの病原性プラスミドの存在を暗示している可能性も考えられる。小林ら<sup>12)</sup>は、家畜由来 VTEC とヒト由来 VTEC の *eaeA* と Ehly の保有状況を比較し、この 2 因子がヒトへの感染性の有用な指標となりうるのではないかと提唱しており、今後もさらに調査検討を重ねる必要がある。

#### 参 考 文 献

- 1) 坂崎利一: *Escherichia coli* 概説. 新訂 食水系感染症と細菌性食中毒. 坂崎利一編, 210 - 219, 中央法規出版, 東京 (2000).
- 2) 田村和満、坂崎利一: 腸管病原性大腸菌. 新訂 食水系感染症と細菌性食中毒. 坂崎利一編, 237 - 253, 中央法規出版, 東京 (2000).
- 3) 河野喜美子、山田 亨、八木利喬、伊藤健一郎: 散発下痢症患者からの腸管凝集性大腸菌の検出. 感染症誌, 72, 1275-1282 (1998).
- 4) 坂崎利一、杉山和之: 腸管凝集接着性大腸菌. 新訂 食水系感染症と細菌性食中毒. 坂崎利一編, 254-265, 中央法規出版, 東京 (2000).
- 5) 加藤 玲、尾形和恵、山田澄夫: 散発下痢症由来大腸菌の腸管病原性大腸菌 (EPEC) *eaeA* 遺伝子および腸管凝集性大腸菌 (EAggEC) *aggR* 遺伝子保有状況とその病原性の評価. 感染症誌, 76, 721-729 (2002).
- 6) 森屋一雄、角 典子、中尾昌弘、山崎 貢、齋藤 眞、伊藤健一郎: 散発下痢症患者及び健常乳幼児由来大腸菌における局在性及び凝集性付着大腸菌 (EPEC, EAggEC) 関連遺伝子, *eaeA*, *aggR*, *astA* の保有状況について. 感染症誌, 74, 134-142 (2000).
- 7) 倉園貴至、近 真理奈、山口正則、大関瑤子、伊藤健一郎: 健康者から分離された大腸菌の血清型および病原因子保有状況—埼玉県. 病原微生物検出情報, 21 (5), 95-96 (2000).
- 8) 坂崎利一: 志賀毒素産生性大腸菌. 新訂 食水系感染症と細菌性食中毒. 坂崎利一編, p. 266 - 291, 中央法規出版, 東京 (2000).
- 9) 木村晋亮、小崎明子、佐々木富子、小松原 彰: Beutin 血液寒天培地での溶血性を指標とした腸管出血性大腸菌のスクリーニング. 感染症誌, 72, 223-230 (1998).
- 10) 伊藤文明、山岡弘二、萩野武雄、神辺眞之: 下痢病原性大腸菌における PCR 法. 臨床病理, 43, 772-775 (1995).
- 11) 成松浩志、緒方喜久代、阿部義昭、帆足喜久雄: 大分県における下痢症由来大腸菌の病原性関連遺伝子の保有状況調査. 大分県衛生環境研究センター年報, 29, 51-55 (2001).
- 12) 小林貴廣、成松浩志、世古庄太、三上賢一、瀧 祐一: エンテロヘモリシン溶血と *eaeA* 遺伝子からみた家畜由来 VTEC の危害度評価. 大分県食肉衛生検査所 平成13年度事業概要, 36 - 39 (2001)

# 大分県における小児及び健康成人の髄膜炎菌等の保菌実態調査

鷲見悦子、緒方喜久代、成松浩志、帆足喜久雄

## Investigation of the Incidence of *Neisseria meningitidis* Carrier in Pediatric Patients and Healthy Adult Human in Oita Prefecture

Etsuko Washimi, Kikuyo Ogata, Hiroshi Narimatsu, Kikuo Hoashi

Key words : 髄膜炎菌 *Neisseria meningitidis*、保菌実態調査 investigation of the incidence

### 要旨

県内における髄膜炎菌性髄膜炎等に関する基礎データを把握するため、健康成人と小児科医院受診児童（15歳以下）を対象として髄膜炎菌・インフルエンザ菌（ヘモフィルス属菌）・溶連菌の菌検索を実施した。成人322名、小児科受診児童292名の計614名から髄膜炎菌は検出されなかった。インフルエンザ菌は24名（3.9%）、溶連菌は38名（4.3%）から検出された。

### はじめに

髄膜炎菌性髄膜炎の患者は、毎年世界で30万人あまり、それによる死者は3万人にのぼると言われている。わが国でもかつては流行が見られピーク時（1945年）には4,384例の患者が報告されているが、その後は減少傾向を示し1990年以降では年間報告数は10例未満と激減している。わが国では非常にまれな疾患であるがアフリカ西海岸からエチオピアにかけて African meningitis belt と呼ばれる流行地域があり、また先進国においても局地的な小流行が見られる等の発生状況から、流行株の持ち込み等による不測の集団発生の可能性を常に秘めている<sup>1)</sup>。そのような状況のもと、わが国における髄膜炎菌感染症の現状把握は十分でなく特に細菌学的監視体制の強化が求められる。

髄膜炎菌性髄膜炎の流行予測やワクチン導入の必要性を探るためには全国的な患者発生動向と、健康保菌者の実態などの基礎的データの把握が重要である。このため平成12年度から14年度にかけて全国11地方衛生研究所の髄膜炎菌検査法の統一マニュアル化を図り、次いで、各地域における髄膜炎菌保菌者の実態調査を実施した。検体採取部位は咽頭としたが、同部位からの検体は、インフルエンザ菌と溶連菌検出にも利用可能であったため同時にそれらの検

査も行った。

今回、大分県における調査結果をまとめたので報告する。

### 材料及び方法

平成12年度から平成14年度まで614名、うち男性297名、女性317名を対照として検査した。被験者は成人及び学生と市内4小児科で主に上気道炎を呈して受診した児童（15歳以下）でその年齢別構成は表1のとおりである。614名の咽頭ぬぐい液を検体として髄膜炎菌及びインフルエンザ菌（ヘモフィルス属菌）、溶連菌の検出を行った。検索方法は黒木らの方法に準拠し<sup>1)</sup>髄膜炎菌については、MTM培地に検体を採取した綿棒で全面に塗抹後、37°Cで24時間炭酸ガス培養（ローソク培養）し、直径1～2mmの半透明で光沢ある正円形集落を釣菌、その後ケログ培地にて純培養し、IDテスト HN-20Rapid（日水）で生化学的性状試験を行い、更に必要に応じてゴノチェックIIキット（E・Y Laboratories Inc.）を用いて、類縁菌との鑑別を行った。MTM培地作成時、ヘモグロビン沫溶解時の精製水の加温温度は37°C前後とした。インフルエンザ菌（ヘモフィルス菌）はバシトラシン加チョコレート寒天培地に検体を採取した綿棒を平板の1/4程度塗りつけ更に独立集落ができるように白金耳で広げ、髄膜炎菌と同様炭酸ガス培養後、

直径1~2mmの灰白色質湿潤で溶けかかったバターのようにやわらかい集落を釣菌し、チョコレート寒天培地にて純培養し、IDテスト及びポルフィリンテストを行った。

溶連菌については常法<sup>2)</sup>に従った。

### 結 果

髄膜炎菌については成人322名及び小児292名のいずれからも検出されなかった。インフルエンザ菌は小児から23名(7.9%)、成人から1名(0.3%)溶連菌は小児から28名(9.6%)成人から8名(2.5%)検出された(表1)。また、平成14年度はインフルエンザ菌の検査に伴ってヘモフィルス属菌の精査も実施したところ、*H. parainfluenzae* が健康成人で65.0%、受診小児で43.6%、平均52.8%から検出された(表2)。

### 考 察

髄膜炎菌性髄膜炎は感染症第4類全数報告疾患であるが、わが国での発生は毎年10例前後と極めて少数である<sup>1)</sup>。一方、海外での発生状況によっては、流行株の持ちこみ等による不測の集団発生の可能性を常に秘めている。

このような状況のもと、今回の大分県の調査では健康者からインフルエンザ菌が1名、溶連菌が8名から検出されたが、髄膜炎菌については検出されず患者及び健康保菌者はかなり低率と考えられる。また、小児科受診者ではインフルエンザ菌が2名から、溶連菌が28名から検出されたが、健康成人同様に髄膜炎菌については検出されなかった。平成12年から14年までの3年間に全国11地方衛生研究所が行った髄膜炎菌性髄膜炎検査法の発生動向調査及び検出方法の研究において髄膜炎菌が検出されたのは4県で

表1 髄膜炎菌等の保菌調査結果(平成12年度~平成14年度)

検体数		検出数							
年齢(歳)	総数	男女別		髄膜炎菌		インフルエンザ菌		溶連菌	
		男	女	男	女	男	女	男	女
0	31	16	15	0	0	1	1	1	0
1-5	204	105	99	0	0	9	6	8	8
6-10	52	30	22	0	0	3	3	7	4
11-15	7	3	4	0	0	0	0	0	0
16-20	132	30	102	0	0	0	0	2	1
21-30	112	53	59	0	0	1	0	2	0
31-40	20	15	5	0	0	0	0	2	1
41-50	20	18	2	0	0	0	0	2	0
51-60	36	27	9	0	0	0	0	0	0
60以上	0	0	0	0	0	0	0	0	0
合計	614	297	317	0	0	14	10	24	14
(%)	100	48.4	51.6	0	0	4.7	3.2	8.0	4.4
				0		3.9		6.2	

表2 その他の菌の検出状況(平成14年度)

検体	検体数	<i>H. parainfluenzae</i>	<i>Lactamica</i>	<i>Moraxella</i>	<i>B. catarrhalis</i>	その他の菌(※)
健康成人	137	89(65.0)	0	3(2.2)	0	15(10.9)
小児科受診者	179	78(43.6)	18(4.5)	6(7.7)	8(10.3)	24(30.8)
計(%)	316	167(52.8)	18(5.7)	9(2.8)	8(2.5)	39(12.3)

※ *Capnocytophaga*, *N. subflava*, *Oligella*, *H. paraphrohaemolyticus*, *Neisseria*, *H. haemolyticus*, *G. vaginalis*

あった(平均0.5%)<sup>3)</sup>。神奈川県2,104名中11名(0.5%)、愛媛県1,315名中11名(0.8%)、福島県206名中2名(1.0%)、沖縄県85名中2名(2.4%)で、4県計3,710名中26名であった。性別では男性が18名、女性が8名であり、フィッシャーの正確確立検定では男女の検出率に有意差を認めた( $P < 0.05$ )。髄膜炎菌性髄膜炎は髄膜炎菌を原因とする主要な細菌性髄膜炎の一つであり唯一集団発生あるいは流行性に発生する髄膜炎であることから流行性髄膜炎とも呼称される人固有の疾患である。また26名中25名が16歳から30歳までであったが4)これは今回の検査対象者がこの年齢層に集中していたためと考えられ一概にハイリスクな年齢層とはいえない。わが国での現在の健康保菌者の状況からひとたびその流行がおこったときの不測の事態に対処するためにも、1945年当時の流行発生状況から60歳以上の高齢者にもその対象を広げ、今後も実態把握に努める必要があるものとする。

小児科受診児童では、上気道炎を起こした小児呼吸器疾患においてインフルエンザ菌の感染が高率を占める傾向が見られた。インフルエンザ菌は莢膜多糖類の抗原性の違いにより6種の血清型に分類され、病原性とも関連がある。重症全身感染からの分離株はb型(Hib)が多い<sup>4)</sup>。今回の調査では、受診小児の検出25名中2名についてはb型であった。

また、今回の調査に関連して行ったヘモフィルス菌検索では、表2にみられるように*H. parainfluenzae*が健康成人で65.0%、受診小児で43.6%、合計52.8%と高い割合で検出された(平成14年度)。愛媛県立中央病院の調査報告でも、摘出扁桃断面について同様の結果(成人の57%から検出)が得られており<sup>3)</sup>、健康成人を含めて同菌が高率で常在している可能性が示唆された。*H. parainfluenzae*の高率での存在が、インフルエンザ等の呼吸器感染症の流行に関係しているかどうかについては今後の調査検討が必要である。

## 文 献

- 1) 髄膜炎菌*N. meningitidis* (一部淋菌*N. gonorrhoeae*を含む) 検査マニュアル: 印刷中
- 2) 厚生省レファレンスシステム研究班編 溶血レンサ球菌検査法(1985)
- 3) 井上博雄ほか: 髄膜炎菌性髄膜炎検査法の発生動向調査及び検出方法の研究: 厚生労働科学研究費補助金(新興・再興感染症研究事業)平成14年度分担研究報告書(2002)
- 4) 吉田真一他編: 「戸田新細菌学、改定32版」, p. 524-526(2002), 南山堂

