

ウエルシュ菌とノロウイルスが検出された 社会福祉施設における事例について

柳本 恵太, 大沼 正行, 西潟 剛, 植松 香星

Detection Cases of *Clostridium perfringens* and Norovirus Occurred in Social Welfare Facilities

Keita YANAGIMOTO, Masayuki OONUMA, Tsuyoshi NISHIGATA and Kosei UEMATSU

キーワード：ウエルシュ菌, ノロウイルス, PFGE, 混合感染

ウエルシュ菌は耐熱性芽胞を有する偏性嫌気性グラム陽性桿菌であり、CPE と呼ばれるエンテロトキシンを産生する場合、腹痛、軽度の下痢等を引き起こすことがある。ウエルシュ菌を原因とする年間の食中毒件数は全国で 20~40 件程度とそれほど多くはないものの、1 件あたりの患者数は 50~100 人程度と多い傾向にあり、多くの場合気温が高くなる夏季に発生している¹⁾。また、社会福祉施設などにおける同菌の感染症事例も報告されており、食品以外による感染の可能性が示唆されている^{2), 3)}。

一方、ノロウイルスはカリシウイルス科の 1 本鎖 RNA ウィルスであり、エンベロープを持たないため、アルコールなどの消毒薬に耐性を示す。年間の食中毒件数は全国で 300~400 件程度、患者数は 1 万人を超えることが多く、原因物質としていずれも最多となっている¹⁾。原因食品としては二枚貝が挙げられるが、調理従事者が同ウィルスに感染していた場合、調理従事者由来のノロウイルスによる食中毒も発生する。また、吐物などの不適切な処理により感染症を引き起こすことがあり、食中毒と合わせ秋季から冬季にかけての急性胃腸炎の主要な原因となっている。特に乳幼児や高齢者、慢性疾患を有する患者などでは重篤化し、死亡例も報告されている⁴⁾ことから、これらに関連する施設では特に注意が必要である。

このような状況の中、山梨県内において 2013 年の冬季に食事が共通である 2 つの社会福祉施設において、ウエルシュ菌とノロウイルスが同時に検出された事例が発生したので報告する。

方 法

1 ウエルシュ菌の分離

ウエルシュ菌の分離については検体を TGC 培地 (栄研

化学)で 80、10 分間加熱し、37 で一夜培養後、カナマイシン不含卵黄加 CW 寒天培地 (ニッスイ) に塗抹し、37 で嫌気培養した。ウエルシュ菌様コロニー (乳糖分解、レシチナーゼ反応陽性) のうち PCR によりエンテロトキシン遺伝子 (*cpe*) が陽性となったものをウエルシュ菌とした。

2 ウエルシュ菌血清型別

ウエルシュ菌の血清型別は耐熱性 A 型ウエルシュ菌免疫血清「生研」(デンカ生研)を用いて行った。

3 ウエルシュ菌パルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) 法

菌株を BHI broth (Oxoid) で嫌気条件下 42、4 時間培養後、1 ml を 10,000 rpm で 5 分間遠心し、上清除去後、150・l の精製水で懸濁した。等量の 1% Sea Kem Gold agarose を加え、プラグを作成し、1 mg/ml Lysozyme 添加 0.5 M ED-TA (pH 8.0) 溶液で 37、1 時間溶菌した。次に 1 mg/ml proteinase K、1% N-lauroylsarcosine 添加 0.5 M EDTA (pH 8.0) 溶液で 50、一夜処理し、4 mM Pefabloc SC 溶液で処理後、制限酵素 *Sma*I 及び *Nru*I を用いて PFGE を行った。泳動条件は 6 V/cm、パルスタイム 0.5~40 秒、14、20 時間で行った。

4 ノロウイルス検査

ノロウイルスの検査は検体を 10% 乳剤とし、QIAmp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN) を使用して RNA 抽出を行い、RT-PCR により得られた cDNA をリアルタイム PCR により同定した。

結 果

1 事例の概要

2013年の冬季に山梨県内の社会福祉施設Aにおいて嘔吐、下痢、発熱（37～38℃）を主症状とする患者が17名発生し、患者12名、調理従事者9名の糞便検査の結果、患者11名、調理従事者1名からウエルシュ菌、患者1名、調理従事者1名からノロウイルスGIIが検出された。その約1週間後にAと同一の食事を提供している社会福祉施設Bにおいても嘔吐、下痢を主症状とする患者が15名発生し、患者5名の糞便検査の結果、3名からウエルシュ菌、5名からノロウイルスGIIが検出された（表）。これら以外の消化器症状を引き起こす病原体は検出されなかった。このことからBにおける事例はノロウイルスによる感染症として処理された。Aにおける事例は感染症または食中毒という判断はなされなかった。

表 社会福祉施設A及びBにおけるウエルシュ菌、ノロウイルス陽性及び陰性者数

	A		B
	患者	調理従事者	患者
ウエルシュ菌	11/12	1/9	3/5
ノロウイルス	1/12	1/9	5/5
陰性	1/12	7/9	0/5

2 ウエルシュ菌の血清型別

分離されたウエルシュ菌13株について血清型別を行ったところ、全て型別不能（UT）であった。調理従事者由来株についてはさらに16コロニーを追加し行った結果、全てUTだった。

3 ウエルシュ菌 PFGE 解析結果

分離された13株についてPFGEを行った結果、Aの患者由来株では1株を除く8株が同一のパターンを示し、Aの調理従事者とBの患者由来株計4株が同一のパターンであった（図1、2）。この結果は制限酵素が *Sma*I であっても *Nru*I であっても同様だった。また、調理従事者由来株について、16コロニーを追加で行った結果、全て同一のパターンであった。なお、ウエルシュ菌陽性のAの患者は11名であったが、そのうち2名については colony-sweep PCR の結果は陽性であるものの、菌株を分離できなかった。

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 M

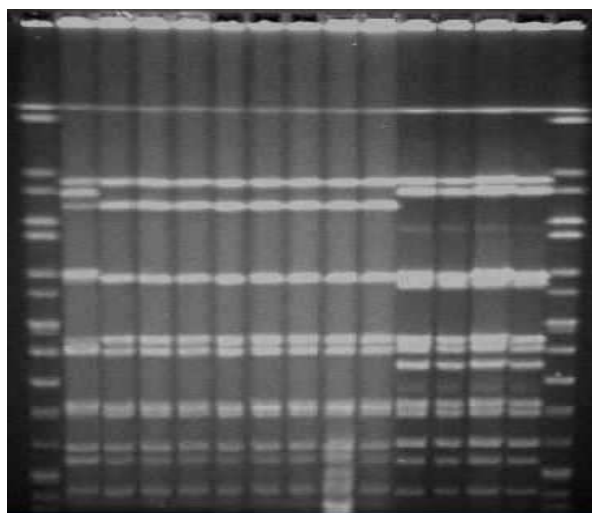


図1 *Sma*Iによるウエルシュ菌PFGE解析結果
1～9: 社会福祉施設A患者由来株、10: 調理従事者由来株、11～13: 社会福祉施設B患者由来株
M: *Salmonella* Braenderup

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 M

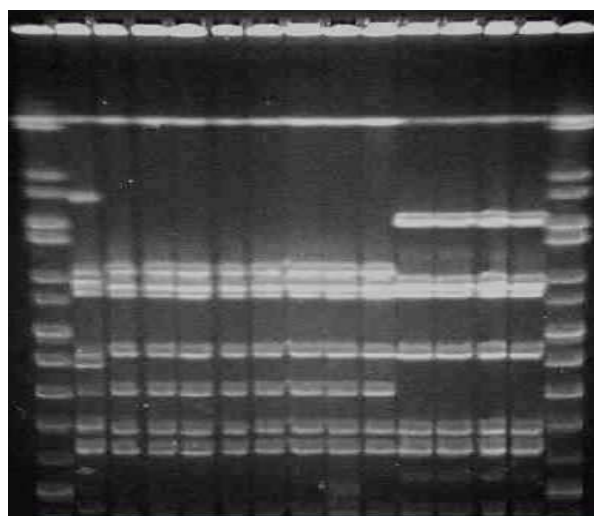


図2 *Nru*Iによるウエルシュ菌PFGE解析結果
1～9: 社会福祉施設A患者由来株、10: 調理従事者由来株、11～13: 社会福祉施設B患者由来株
M: *Salmonella* Braenderup

考 察

本事例では食事を同一にする2つの社会福祉施設で同時期に複数人からウエルシュ菌とノロウイルスが検出された。

ノロウイルスについては社会福祉施設Bの患者の糞便検査を行った結果、5名全員からノロウイルスGIIが検出され、調理従事者1名からも検出された。しかし、同

一の食事が提供されている社会福祉施設 A では 1 名からしか検出されなかった。このことより、B の事例については同ウイルスによる感染症と判断された。A の患者発生については、ノロウイルスが検出された患者は 12 名中 1 名のみであり、同ウイルスが原因とは考えられなかった。

ウエルシュ菌を原因とする消化器症状は食中毒事例が多く発生しているが、感染症事例もわずかに報告されている^{2), 3)}。本事例のウエルシュ菌については A の患者 11 名、調理従事者 1 名、B の患者 3 名から検出され、血清型は全て UT であった。cpe 陽性のウエルシュ菌が健常者から分離される確率は数%以下であるという報告³⁾があることから、これらが複数の患者から偶発的に分離される可能性は非常に低い。また、PFGE の結果、A の患者 9 名中 8 名の PFGE パターンが一致した (図 1, 2)。これらより、A の患者は同一の感染源によりウエルシュ菌を保有した可能性が高いと考えられた。一方で、調理従事者、B の患者 3 名のパターンが一致した (図 1, 2)。B についてはノロウイルスによる感染症と判断されているものの、上記の理由より、ウエルシュ菌による事例も同時に発生していた可能性が考えられた。調理従事者については A と B 双方の患者由来菌株を保有している可能性を考え、16 コロニーについて血清型、PFGE を追加で行ったが、全て B の患者由来菌株と同一型であった。調理は A で行い、A 及び B に調理従事者が配膳するという形式であることから、調理従事者は B で患者と同一パターンの菌株を保有した可能性があること、同一の食事が提供されている A と B の患者のパターンが異なっていることから、本事例のウエルシュ菌の検出は食事以外が原因である可能性も考えられた。ただし、本事例の感染源については検食及び施設のふきとり検体検査が不実施であったため、詳細については解明できなかった。

A における消化器症状の主症状は嘔吐を含んでおり、嘔吐を引き起こすことはまれとされているウエルシュ菌が関連しているかどうかは不明である。しかし、米国では患者の 25% 程度が嘔吐の症状を呈している事例^{5), 6)}もあることから、典型的な症状でないことのみをもって同菌の関連性を否定することは困難である。今回の検体だけでは感染源及び感染経路を究明できなかったため、適切な検体の確保を進めることが今後の課題である。

また、山梨県内に分布しているウエルシュ菌は *Smal* のみでの解析では、結果が不明瞭になる可能性があることが既報⁷⁾で示されていることから、今回の事例ではウエルシュ菌の PFGE の際に *Smal* に加え *Nrul* による解析を行った。結果自体はどちらの制限酵素でも変わらなかったが、結果の信頼性・明瞭性の向上を図ることができたと考えられる。

冬季における消化器症状を原因とする感染症事例の原因はノロウイルスであることが多く、発生の時点で同ウイルスが原因という先入観を持って調査されてしまう場

合や、同ウイルスが検出された時点で原因が決定され、それ以外の検査は中止となってしまうことも多く経験している。その一方で、臨床症状や発生状況によってノロウイルスのみの感染なのか他との混合感染のかが判断できない病原体の場合は、検査によってのみ混合感染の有無が明らかにできると Iizuka ら⁸⁾は主張しており、実際にノロウイルス集団感染症事例の際、ウエルシュ菌が多数分離され、混合感染の存在が示唆されている文献³⁾や腸管出血性大腸菌との混合感染事例⁸⁾もある。混合感染が明らかにされることにより感染源の特定や対策を行う上で有利であると考えられるため、疫学的な解析を勘案しながら、必要に応じてノロウイルス検出後においても細菌検査を続けることに意義があると考えられる。

今回の事例では冬季であるにも関わらずノロウイルスは検出されたものの少数であり、PFGE パターンが一致した多数のウエルシュ菌が検出されるという「意外」な結果と、ノロウイルスの感染症の一方でウエルシュ菌による感染症が発生したと考えられる「見落としやすい」結果となった。今後は先入観をできるだけ排除し、様々な視点から検査を行うことにより、ノロウイルスと他の病原体との混合感染の有無を明らかにしていきたい。

まとめ

- ・今回の事例においてウエルシュ菌は A の患者 12 名中 11 名、B の患者 5 名中 3 名、ノロウイルスは A の患者 12 名中 1 名、B の患者 5 名中 5 名から分離された。
- ・分離されたウエルシュ菌の PFGE パターンは A の患者由来株間、また B の患者由来株間でほぼ同一であり、調理従事者由来株は B の患者由来株と同一パターンであった。
- ・PFGE の結果から食品を介した感染の可能性は低く、施設内からの同一の感染源による保有が考えられた。
- ・ノロウイルスが検出された事例であっても場合によっては、細菌による混合感染を疑い先入観を持たず検査を行うことが重要であると考えられた。

参考文献

- 1) 厚生労働省: 食中毒統計資料 年次別食中毒発生状況・過去の食中毒発生状況 http://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/kenkou_iryuu/shokuhin/syokuchu/04.html
- 2) 深尾敏夫ら: 特別養護老人ホームにおける環境由来と思われるエンテロトキシン産生 *Clostridium perfringens* による集団下痢症, 感染症学雑誌, 78(1), 32-39, (2004)
- 3) 仲西寿男 丸山務監修: 食品由来感染症と食品微生物, 中央法規出版, 380-397, (2009)

- 4) Shinako Inaida et al. : The South to North Variation of Norovirus Epidemics from 2006-07 to 2008-09 in Japan, PLOS ONE, 8(8), 1-5, (2013)
- 5) CDC. : *Clostridium perfringens* Infection Among Inmates at a County Jail --- Wisconsin, August 2008, MMR, 58(06); 138-141, (2009)
- 6) CDC. : Fatal Foodborne *Clostridium perfringens* Illness at a State Psychiatric Hospital - Louisiana, 2010, MMR, 61(32), 605-608, (2012)
- 7) 柳本恵太 植松香星:2012 年に山梨県内で発生したウエルシュ菌食中毒 4 事例, 山梨衛環研年報, 56, 47-50, (2012)
- 8) Setsuko Iizuka et al. : An outbreak of mixed infection of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O26:H11 and norovirus genogroup II at a kindergarten in Shimane, Japan, Jpn J Infect Dis. , 58 (5), 329-30, (2005)