

牧場体験した高校生のクリプトスポリジウム症集団発生事例

福嶋 得忍, 日野 隆信, 後藤 史子¹⁾
進藤 悦男²⁾, 古屋 宏二³⁾

An outbreak of cryptosporidiosis in high school students who experienced
a study tour through a stock farm.

Tokunin FUKUSHIMA, Takanobu HINO, Fumiko GOTO
Etuo SHINDO and Koji FURUYA

I. はじめに

人畜共通感染症であるクリプトスポリジウム症の本邦における第1例目の集団発生は、1994年に神奈川県平塚市の雑居ビルで461名が水道を介して感染した集団下痢症事例¹⁾であり、2例目は、1996年に埼玉県越生町で推定8,812名が水道を介して感染した大規模水系感染事例²⁾である。これら2事例を契機として、我が国でもクリプトスポリジウム症が注目された。クリプトスポリジウムによる水系感染の感染源として、クリプトスポリジウム感染下痢症患者の便やクリプトスポリジウムに感染したウシ、ブタなどの動物の糞によって汚染された水道水や飲食物が指摘されている³⁾。全国の水道事業体では、厚生省による暫定対策指針⁴⁾とその後の同指針の改正⁵⁾に基づいて、維持管理がなされている。その結果、我が国では、1996年以降、クリプトスポリジウム症の集団発生は起きていなかった。しかし、2002年3月に兵庫県内の高校で、北海道へ修学旅行に行った生徒と教職員212名中129名が下痢症状を発症し、有症者67名中61名の便からクリプトスポリジウムのオーシストが分離され、本邦における3例目のクリプトスポリジウム症集団発生となった⁶⁾。さらに、2002年4月には、北海道内の宿泊施設で開催された新入生オリエンテーションに参加した札幌市の専門学校の生徒300名のうち170名が下痢症を発症し、有症者の便からクリプトスポリジウムのオーシストが検出されている^{7,8)}。しかし、両事例とも、宿泊施設等の水道水からクリプトスポリジウムは検出されず、感染源と感染経路の特定には至っていない。千葉県においても、2002年5月末に、北海道へ修学旅行に行った高校生にクリプトスポリジウム症の集団発生が起きた。感染経路として、水系以外の可能性が考えられたので、この事例の概要を示し、感染源と感染経路を考察した。

II. 事例の概要

千葉県柏保健所管内の高等学校の生徒303名、教師13名及び添

乗員3名の合計319名が、2002年5月27日から5月31日まで北海道へ4泊5日の修学旅行に行っていた。学校側は、旅行から戻った6月3日から下痢症状を訴える生徒が始まっていること、6月7日に下痢症状を呈する生徒が集積していることに気付いた。6月11日に学校医と学校の保健主事が管轄の保健所へ相談に訪れた。有症者8名に共通する行動は、旅行日程2日目(5月28日)の午前中に実施したA牧場での仔牛の世話(餌や水の交換, 耳標付け), 小動物の世話(鶏, アヒル, ヤギ, イヌ, ポニーの畜舎清掃), 牛の追い込み等の牧場体験であった。A牧場での牧場体験者は、症状のない1名を含めて計9名であった。保健所が調査を行った結果、8名の有症者グループ以外に発症者はみられないこと、牧場体験後の昼食は、別の牧場(B牧場)で仔牛のミルク飲ませ等の牧場体験をした9名と一緒に宿泊施設が調理したカレーライスと飲み物を摂っていること、有症者のみに共通した飲食物はないことがわかった。発症者は全員男子生徒(16~17歳)で、主症状は、水様性下痢(5~20回), 腹痛, 発熱(37.7~38.6℃)及び吐き気であった。発症日時は5月30日の夕方から6月5日午前6時までであった。有症者の家族に症状を訴えている者はいなかった(表1)。A牧場からの聞き取り調査では、過去に、同牧場で初めて畜産に従事した者に下痢や発熱の症状を呈したことがあったが、現在は同牧場の従事者に下痢症状を呈する者はいない。

表1. 集団下痢症発生事例の概要

発生の届け出日	6月11日
修学旅行期間	5月27日~5月31日
初発患者発生日	5月30日
最終患者発生日	6月5日
有症者数	男子生徒8名(16~17歳)
有症者のみに共通の飲食物	無し
8名に共通する行動	5月28日の午前中に実施したA牧場での仔牛の世話等の牧場体験
A牧場での牧場体験者数	症状の無い1名を含めて9名
8名以外の有症者	無し
有症者の家族での発症	無し

III. 材料および方法

1. 検査材料

A牧場での農業体験者9名(発症者8名及び無症状者1名)から、下痢症発症後8~13日目または20日目に1回目の検便を実施し、

千葉県衛生研究所

- 1) 千葉県柏保健所(現.千葉県健康福祉部健康福祉政策課)
- 2) 千葉県柏保健所
- 3) 北海道立衛生研究所(現.国立感染症研究所寄生動物部)
(2004年1月16日受理)

細菌検査及び原虫検査を行った。さらに、1回目の検便から12～14日後に2回目の検便を実施し、細菌検査と原虫検査を行った。2回の検便とも、ウイルス検査は行わなかった。また、修学旅行前後の高校内での感染の可能性を考慮し、高校内の上水道2ヶ所の飲料水について、細菌検査と原虫検査を実施した。

2. 便からのクリプトスポリジウムのオーシストの分離

便検体のアセトン処理・パーコール蔗糖密度勾配遠沈法¹⁰⁾で便検体中のクリプトスポリジウムのオーシストを分離した。すなわち、便検体を0.8%食塩水で約10倍に希釈し、4℃冷アセトンで一晩固定後、比重1.10のパーコール・蔗糖溶液を用いた密度勾配遠沈法でクリプトスポリジウムのオーシストを精製し、蛍光抗体染色法による検査に供した。

3. 蛍光抗体染色法によるクリプトスポリジウムのオーシストの検出

便検体から精製した比重1.10以下の粒子を孔径1.0μm、直径25mmのPTFE製メンブレンフィルター (Toyo Roshi Kaisha, Ltd., Japan) 上に捕捉し、クリプトスポリジウムのオーシストとジアルジアのシストの同時検出用間接蛍光抗体染色キットHYDRO-FLUOR Combo (EnSys Inc., NC) を用いて染色後、粒子の染色性をB励起条件下、落射型蛍光顕微鏡E8TE-FL-DIC-CRP (Nikon Co. Ltd., Japan) で観察し、さらに微分干渉装置を用いて粒子サイズの測定と微細構造の観察を行い、クリプトスポリジウムのオーシストの有無を判定した。

4. PCR-RFLP法によるクリプトスポリジウム遺伝子の解析

Carraway M.ら及びYagita K.らの方法^{12,13)}で便検体からオーシストを分離・精製し、精製オーシストから鋳型DNAを抽出後、クリプトスポリジウムのThreonine-rich open reading frame 遺伝子 (poly-T locus) に特異的な合成プライマーcry44 (5'-CTCTTAATCCAATCATTACAAC-3') 及びcry373 (5'-AGCAGCAAGATATGATACCD-3') を用いた Polymerase Chain Reaction (PCR) 法で*C.parvum* のポリスレオニン遺伝子の518bp領域を増幅した。PCR増幅産物は、制限酵素*Rsa* Iで処理後、2%アガロースゲル電気泳動法で分離した。泳動後、ゲルをエチジウムブロマイドで染色し、PCR増幅産物の*Rsa* Iによる Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) のパターンをヒト型 (genotype 1) またはウシ型 (genotype 2) の陽性コントロールと比較し、下痢症患者の便から分離したクリプトスポリジウムの遺伝子型を同定した。

IV. 検査結果

1. 下痢症原因微生物の検索

A牧場で牧場体験者9名の1回目の検便検体について細菌検査と原虫検査を行った結果、細菌検査では9検体全例、赤痢、コレラ、チフス、パラチフス、病原性大腸菌および食中毒菌15項目のいずれも検出されなかった。蛍光抗体染色法と微分干渉観察法による原虫検査では、有症者8名のうち5名の便検体からクリプトスポリジウムのオーシストが検出された。ジアルジアのシストは、9検体全例で検出されなかった。クリプトスポリジウムが検出された5名について、1回目の検便から12～14日後に採取した2回目の検便検体の原虫検査では、5検体のいずれも、クリプトスポリ

ジウムおよびジアルジアは検出されなかった。学校内の上水道2ヶ所から採取した水試料2検体の検査では、クリプトスポリジウムおよびジアルジアのいずれも検出されなかった。

2. PCR-RFLP法によるクリプトスポリジウムの遺伝子型の同定

蛍光抗体染色法と微分干渉観察法でクリプトスポリジウムのオーシストが検出された5名の便のうち、3名の便から分離・精製したクリプトスポリジウムのオーシストのDNAのPCR-RFLP分析を行った結果、3例ともヒト型ではなくウシ型 (genotype 2) であった (図1)。

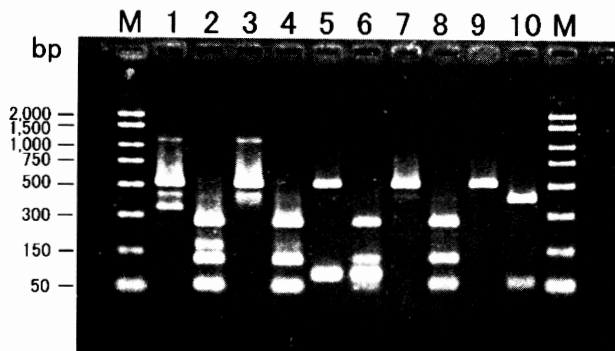


図1 下痢症患者の便から分離したクリプトスポリジウムのポリスレオニン遺伝子領域のPCR-RFLP法による泳動パターン

レーン1～6: 3名の患者から分離したクリプトスポリジウム
レーン2,4及び6: プライマー cry373とcry44によるPCR増幅産物の制限酵素*Rsa* I 切断RFLPパターン
レーン7と8: 陽性対照のウシ型 (genotype 2) *C.parvum*
レーン9と10: 陽性対照のヒト型 (genotype 1) *C.parvum*
レーン8と10: PCR増幅産物の*Rsa* I 切断RFLPパターン
レーン1,3,5,7,9: *Rsa* I 無処理PCR増幅産物の泳動パターン
レーンM: サイズマーカー

V. 考察

本邦で2002年に相次いでクリプトスポリジウム感染による下痢症の集団発生が起きているが、いずれの事例でも、クリプトスポリジウムの感染源と感染経路は突き止められていない。また、2002年の事例は、本邦最初の神奈川県での事例⁹⁾や2例目の埼玉県での事例¹⁰⁾とは異なり、水系感染であるとの証拠が見当たらず、クリプトスポリジウム感染による下痢症の集団発生を予防するための対策に新たな問題をもたらしている。兵庫県内の高校生の事例や札幌市の専門学校生の事例では、下痢症患者の便から分離したクリプトスポリジウムの遺伝子型がヒト型 (genotype 1) であり、飲食物を介した感染が疑われたが、感染源と感染経路の特定には至らなかったと報告されている^{8,9,10)}。しかし、千葉県内の高校生の本事例では、有症者の便から分離されたクリプトスポリジウムの遺伝子がウシ型 (genotype 2) であったことから、牧場体験時に、ウシなどの動物からヒトを介さずに感染した可能性が考えられた。有症者がA牧場で接した仔牛などの動物の糞を検査することは出来なかったが、有症者の8名と症状の出なかった1名の計9名は、A牧場で仔牛と密接に接触する機会が多く、仔牛から直接感染した可能性が高いと思われた。1名が下痢症にならなかった理由は不明であるが、仔牛との接触頻度や免疫力の個人差によりクリプトスポリジウムが感染しなかったのかも知れない。

本事例では、情報探知時 (初動時) において、有症者に牧場体

験という特異的な共通行動があるとの情報を得ていたことから、細菌検査を実施すると同時に原虫検査も実施した。その結果、下痢症の病原体がクリプトスポリジウムであることを突き止めることが出来た。また、管轄保健所、県の健康増進課・衛生指導課及び衛生研究所が初動時から密な情報交換と連携で対処した。その結果、2次感染防止のための有症者と旅行参加者に対する保健指導を効果的に実施することが出来た。さらに、保健所内における横断的な協働での調査と対応のみならず、関連機関相互の密な情報交換と連携が必須であることが再確認出来た。

V. まとめ

1. 2002年5月末に、千葉県内の高等学校で、生徒8名の集団下痢症が発生した。
2. 有症者8名のうち5名の便からクリプトスポリジウムのオーシストが検出された。病原性の細菌は検出されなかった。
3. 有症者の便から分離されたクリプトスポリジウムの遺伝子型は、検査した3例全てがウシ型 (genotype 2) であった。
4. 有症者8名に共通する行動は、修学旅行先の同一牧場における仔牛の世話などの牧場体験であった。
5. 高等学校内の上水道2ヶ所の飲料水からクリプトスポリジウムは検出されなかった。
6. クリプトスポリジウムの感染源と感染経路は特定できなかったが、仔牛の世話などの牧場体験時に、飲食物を介さずに感染した可能性が考えられた。
7. 患者家族や他の集団への二次感染はなかった。

引用文献

- 1) 黒木 俊郎, 渡辺 祐子, 浅井 良夫, 他 (1996): 神奈川県内で集団発生した水系感染*Cryptosporidium* 症. 感染症学雑誌, 70(2), 132-140.
- 2) 山本 徳栄, 中川 善雄, 羽賀 道信 (1998): 水道水によるクリプトスポリジウムの集団感染例—国内および海外の事例—. 化学療法の領域, 14(2), 255-263.
- 3) Norishige Yamamoto, Ken-ichi Urabe, Masatoshi Takaoka, Kiyooki Nakazawa, Atsushi Gotoh, Michinobu Haga, Hiroshi Fuchigami, Isao Kimata and Motohiro Iseki (2000): Outbreak of cryptosporidiosis after contamination of the public water supply in Saitama prefecture, Japan, in 1996. 感染症学雑誌, 74(6), 518-526.
- 4) 塩田恒三 (1998): 家畜・野生動物におけるクリプトスポリジウム感染の実態—環境水汚染源としての意味—. 化学療法の領域, 14(2), 248-254.
- 5) 北澤弘美, 国包章一, 眞柄泰基 (1999): 水道水源におけるクリプトスポリジウム及びジアルジア実態調査結果の解析. 水道協会雑誌, 68(4), 22-31.
- 6) 厚生省生活衛生局水道環境部長通知「水道におけるクリプトスポリジウム暫定対策指針」平成8年10月4日付け.
- 7) 厚生省生活衛生局水道環境部長通知「水道水中のクリプトスポリジウムに関する対策の実施について」平成10年6月19日付け.
- 8) 押部智宏, 辻 英高, 小野一男, 増田邦義 (2002): クリプトスポリジウムの集団感染事例—兵庫県. 病原微生物検出情報, 23(6), 145.
- 9) 押部智宏, 辻 英高, 池野まり子, 他 (2003): 集団下痢症の原因となった*Cryptosporidium parvum* の遺伝子解析. 平成14年度日本産業動物獣医学会・日本小動物獣医学会・日本獣医公衆衛生学会年次大会抄録集, p410-411.
- 10) 古屋宏二, 八木欣平, 伊東拓也, 他 (2003): 2002年北海道で集団発生したクリプトスポリジウムの遺伝子型について. 第50回日本寄生虫学会・日本衛生動物学会北日本支部合同大会プログラム・講演要旨 p.26.
- 11) 福嶋得忍, 日野隆信, 水口康雄 (2000): PCR法による水試料及び糞便検体中クリプトスポリジウムの検出. 千葉衛研報告, 24, 22-26.
- 12) Carraway M, Tzipori S, Widmer G (1997): A new restriction fragment length polymorphism from *Cryptosporidium parvum* identifies genetically hetero-geneous parasite populations and genotypic changes following transmission from bovine to human hosts. Infect. Immun., 65, 3958-3960.
- 13) Yagita K, Izumiyama S, Tachibana H et al (2001): Molecular characterization of *Cryptosporidium* isolates obtained from human and bovine infections in Japan. Parasitol. Res., 87, 950-955.