

大分感染症研究会

第49回例会 一般演題抄録集

(日本医師会生涯教育制度適合学術集会)

(ICD 協議会認定研究会：2単位)

日 時：平成23年9月1日（木） 18：30～20：30

場 所：大分東洋ホテル 2F「二豊の間」

大分市田室9-20 TEL097-545-1040

例会長：大分大学医学部 環境・予防医学講座

教授 山岡 吉生

共 催：大分感染症研究会

杏林製薬株式会社

クドア検査法の開発

大分県衛生環境研究センター 微生物担当¹⁾

大分県豊肥保健所 衛生課²⁾

大分県豊後大野家畜保健衛生所 防疫検査班³⁾

○小河正雄¹⁾、若松正人²⁾、人見徹³⁾、加藤聖紀¹⁾、緒方喜久代¹⁾

はじめに

近年、生食用生鮮魚介類を共通食とする原因不明有症事例が増加している。症状は、嘔吐、下痢が中心で一過性であり、潜伏時間は2～6時間と細菌性食中毒やウイルス性食中毒に比べて短い。厚生労働省はその病因物質や原因食品を明らかにするため国立医薬品食品衛生研究所を中心とした調査研究事業を2009年から開始した。2010年5月に、大西、黒田らは有症例のヒラメ残品と購入したヒラメの筋肉組織の網羅的遺伝子解析を行い、有症例のヒラメ筋肉に寄生虫の一種であるクドア属粘液胞子虫の遺伝子が多く検出されることを報告した¹⁾。我々は、クドアが食中毒の原因物質である可能性を明らかにするために、リアルタイムPCR法を開発し、有症例のヒラメ、及び患者の便、吐物についてクドア遺伝子の検出状況を調査したので、報告する。

方法

1. DNAの抽出

ヒラメの筋肉からのDNA抽出はQIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN)を用いた。患者の糞便、又は吐物からのDNAの抽出にはQIAamp DNA Stool Kit (QIAGEN)を用いた。

2. PCR及びシーケンス

PCRは、18SリボソームRNA遺伝子を標的としたElvira Abolloらのプライマーを使用した²⁾。特異的なバンドが検出されたPCR産物は3130x1 ジェネティックアナライザ(ABI)で遺伝子配列を決定した。

3. Real Time PCR

*Kudoa septempunctata*³⁾(以下 *K. septempunctata*)の18SリボソームRNA遺伝子の配列を基にTapMan法に用いるプライマーとプローブの設計を行った。フォワード側のプライマーは、Kudoa3F (TGTAATAATTGCTCACGAAAGAGGAA)を、リバース側のプライマーは Kudoa3R (CAAAGGGCAGAGACTTATTCAACA)を、プローブは Kudoa3P (FAM- TCCTCGTAAGCGGAGTCATCAGCTC-TAMURA)を用いた。反応条件は、

LightCycler 2.0 (Roche)を用い、アニーリング・伸長 60°C、20 秒のシャトル PCR を 45 サイクル実施した。

結果及び考察

有症事例のヒラメ残品から DNA を抽出し PCR を行ったところ、クドア特異的なバンドを検出した。この遺伝子を、分子系統樹解析したところ *K. septempunctata* であることが判明した。ヒラメ筋肉を顕微鏡で調べたところ、5~6 個の極嚢を持つ粘液胞子が観察された。

11 事例の有症苦情のヒラメ残品についてリアルタイム PCR 検査を実施したところ、全例からクドア遺伝子が検出された。一方、有症事例や食中毒と関連の無いヒラメ 6 個体についてリアルタイム PCR 検査を実施したところ、4 個体からクドア遺伝子は検出されず、2 個体から微量のクドア遺伝子が検出された。これらの結果から、*K. septempunctata* が食中毒の原因物質である可能性が高いと考えられる。患者便は、4 事例 5 件からクドア遺伝子を検出した。患者吐物は、2 事例 2 件からクドア遺伝子を検出した。いずれも、遺伝子量は少なく、検体採取時期が重要だと思われた。

参考文献

- 1) 大西 真、黒田 誠: 超高速シークエンサーを用いた病原因子の網羅的検索, 衛生微生物技術協議会第 31 回研究会講演抄録集, 58(2010)
- 2) Elvira Abollo, Beatriz Novoa, Antonio Figueras: SSUrDNA analysis of *Kudoa rosenbuschi* (Myxosporea) from the Argentinean hake *Merluccius hubbsi*, DISEASES OF AQUATIC ORGANISMS Dis Aquat Org., 64,135-139(2005)
- 3) Matsukane Y, Sato H, Tanaka S, Kamata Y, Sugita-Konishi Y. : *Kudoa septempunctata* n. sp. (Myxosporea: Multivalvulida) from an aquacultured olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) imported from Korea., Parasitol Res., 107(4), 865-72(2010)

脾摘の既往のない成人に発症した劇症型肺炎球菌敗血症の1例

久保徳彦、鳴海篤志、岡崎友里、大石一成、吉河康二、澤部俊之、中本貴人、村武明子、
酒井浩徳、武藤庸一
別府医療センター

【はじめに】劇症型肺炎球菌敗血症は、脾摘後の感染免疫能低下と関連することが知られており、適切な抗生剤使用下でも死亡率は50~80%と重篤な疾患であることから、臨床における敗血症治療の際は常に注意しなければならない疾患である。今回、脾摘も含め明らかな既往症がなく、生来健康であった男性が敗血症を発症し、急激な経過で死亡に至った劇症型肺炎球菌敗血症の1例を経験したので報告する。

【症例】60歳男性。生来健康で、医療機関にてボイラー技士として勤務していた。平成23年6月6日頃より体調不良を訴え、6月13日夜に悪寒、戦慄を伴う38.9℃の発熱を認めたため、翌6月14日午前中に勤務先である医療機関の外来を受診した。血液学所見にてWBC=8300/ μ L、CRP=5.2mg/dLと軽度炎症反応を認めたが、他の異常は認めないことより、CAMを処方され午後4時頃帰宅した。午後4時30分過ぎ、自宅にて失禁し蒼白となって倒れているところを妻が発見、救急要請し当院へ救急車で搬送された。当院来院時、体温37.5℃、血圧82/47 mmHg、心拍数94/分、呼吸数26/分、意識レベルはJCS II-10、GCS E3V5M5、末梢冷感が著明で、全身チアノーゼ、紫斑を認めた。直ちに気管内挿管等の救命措置を行い、血液検査、尿検査、心電図、頭部CT、胸部~腹部CT等の全身精査を行った。プロカルシトニン>10ng/mLより重症敗血症によるショックと診断したが、原因と考えられる感染巣は不明であった。腹部CT画像所見で、脾臓の委縮を認めた。ヒドロコルチゾン、カテコラミン、MEPM、 γ -グロブリン製剤、アルブミン製剤、PDEⅢ阻害薬投与で治療を開始した。さらに持続的血液濾過透析(CHDF)、エンドトキシン吸着療法(PMX)、新鮮凍結血漿、血小板輸血、メシル酸ガベキサート投与を行ったが播種性血管内凝固、多臓器不全は進行し、入院2日目の6月15日午後1時51分に死亡した。後日、動脈・静脈の血液培養からともに肺炎球菌が検出され、劇症型肺炎球菌敗血症と診断した。

【結語】敗血症の症例において、脾摘の既往がない場合でも、腹部エコーやCTによる画像所見で脾臓低形成を疑う場合、劇症型肺炎球菌敗血症の可能性を考え、慎重に診断および治療をする必要があることが示唆された。また、劇症型肺炎球菌敗血症を発症した場合は死亡率が高いため、予防として有効な肺炎球菌ワクチンの啓蒙も重要であると示唆された。

トルコ、バングラデシュにおける急性下痢症小児患者からのウイルス検出・分子疫学的解析

三井マルセロ孝広¹⁾ アハメド・カムルディン²⁾ 西園晃¹⁾

1) 大分大学医学部微生物学講座 2) 大分大学全学研究推進機構

1. 背景

感染性胃腸炎は呼吸器感染症に次ぐ大きな感染症である。5歳未満の子どもでは、ロタウイルス感染症で1年間に40~60万人が死亡し、ノロウイルス感染症では約20万人が死亡すると推定されている。また、細菌性胃腸炎での死亡が抗生薬の使用により減ってきたために、ウイルス性胃腸炎による死亡の割合が増加している。

胃腸炎を起こす主要な起病病原体として、ロタウイルス、アデノウイルス、ノロウイルス、サポウイルスおよびアストロウイルスが挙げられる。その他のウイルスとして、パレコウイルス、アイチウイルス、コロナウイルス、ピコビルナウイルス等が知られており、特に、2005年に発見されたボカウイルスは新たに注目されている。また、ウイルス性胃腸炎では、数種類のこれら病原ウイルスによる混合感染が起こることが知られている。

2. 目的

これまでウイルス性下痢症による混合感染の詳細な報告は少なく、また、近年、下痢症に関連する新たなウイルスとして発見されたボカウイルスについて、トルコおよびバングラデシュからの報告例はない。本研究は、トルコおよびバングラデシュにおける小児急性下痢症患者から採取した糞便中のウイルス遺伝子を検出し、その詳細な分子疫学的解析を行うことである。

3. 方法

急性下痢症小児患者から採取されたロタウイルス陰性の糞便サンプルを用い、トルコのアンカラ市から150検体(2003~2005年)、バングラデシュのダカ市から138検体(2005~2006年)を対象とした。糞便サンプルから核酸抽出を行った後、ボカウイルス、ノロウイルス、アストロウイルス、アデノウイルスの検出をPCR法、もしくはRT-PCR法で行った。

陽性と確認されたPCR反応に対して、塩基配列をダイレクトシーケンスで特定し、ボカウイルス、アストロウイルス陽性の反応に対してはすべて、その他のウイルスに関しては陽性と反応した10%のサンプルの塩基配列を特定した。これらの塩基配列を用い遺伝子型の決定、分子的特徴解析、系統樹作成を行った。

4. 結果

トルコではアデノウイルスが単一で60%と最も多く見られた一方、バングラデシュではボカウイルス、ノロウイルスGII、アデノウイルスの混合検出が34%と最も多く見られた。

また、単一感染が疑われた検体はトルコで全体の63%、バングラデシュでは21%であり、多重感染が疑われた検体はトルコで14.6%、バングラデシュでは68%であった。

トルコにおけるボカウイルス検出率は、他の気域での報告と同程度(8.6%)であったが、バングラデシュでは63%と非常に高かったことが分かった。さらに急性胃腸炎の原因とされているボカウイルス2Aが優勢であった。バングラデシュではノロウイルスGIIが71%と高い割合で検出された。

アデノウイルスはそれぞれトルコとバングラデシュで74%と65%と多数検出され、腸管アデノウイルスである40、41型以外にも呼吸器関連の6型、12型の存在が遺伝子解析により分かった。

アストロウイルスはそれぞれ2.6%と9.4%と検出され、トルコではこれまで全世界2カ国でしか報告されていないMLB-2亜種が一例確認された。

5. 考察

トルコおよびバングラデシュのウイルス性小児急性下痢における病原ウイルスを検出し、さらに、その遺伝子情報を元に系統樹解析を行うことで、分子疫学的特徴とそのダイバーシティを明らかにした。

バングラデシュでは多重検出においてダイバーシティが多く見られたことから混合ウイルス性急性下痢症においては地域、季節性の有無が示唆された。

今回初めて、トルコ、バングラデシュからボカウイルスの流行状況を明らかにした。トルコにおけるボカウイルス検出率は、これまで他の地域での報告と同程度であったが、バングラデシュでは非常に高くさらに他のウイルスとの混合検出が多く見られたことから共感染でのバイスタンダーとしての役割が示唆された。

今後の課題として、その病原性と混合感染における役割および機序の解明、また他のウイルスのスクリーニングの必要性が挙げられる。

慢性萎縮性胃炎症例における *Helicobacter pylori* 除菌治療による 10 年間の長期経過

大分大学医学部消化器内科

兒玉雅明、平下有香、小川 竜、松成 修、綿田雅秀、中川善文、内田政広、水上一弘、
沖本忠義、村上和成、藤岡利生

【目的】慢性萎縮性胃炎および腸上皮化生は胃癌の発生母地としても重要な疾患である。現在まで除菌後胃粘膜変化の報告は多いが、胃全体にて長期間観察した報告は見られない。本研究では *H. pylori* 除菌後 updated Sydney system の 5 点において 10 年間の長期間にわたる経時的な組織学的な変化を検討し、除菌治療による萎縮性胃炎および腸上皮化生の改善については胃発癌の予防の可能性を検討した。

【方法】229 症例(男:131, 女:88, 平均年齢 58 歳)を解析、*H. pylori* 陰性群、除菌成功群、除菌不成功群の経過を観察した。また 30 例は *H. pylori* 除菌治療後 10 年にわたり 1 年おきに内視鏡検査および updated Sydney system 5 点生検による経時的な経過観察をおこなった。対照群として *H. pylori* 感染持続例は 21 例、*H. pylori* 陰性例は 14 例であった。萎縮、腸上皮化生の程度を updated Sydney system に従って 0-3 (0; none, 1; mild, 2; moderate, 3; marked) の 4 段階にスコア化し比較検討した。また初検時の内視鏡的萎縮度を Kimura-Takemoto 分類にて萎縮軽、中、高度に群別し、内視鏡的萎縮度の変化を観察した。

【結果】5 点生検 10 年にわたる観察において、胃炎スコアは除菌半年後から 5 点全ての部位で有意な低下を認めた。萎縮スコアは 5 点すべてにおいて有意な低下を認めたが、前庭部大弯、胃角小弯、体部小弯は 1 年、前庭部小弯は 6 年、体部大弯は 0.5 年で有意な低下を見た。腸上皮化生は長期の経過にてスコアの変動が大きくみられたが体部小弯では 6 年以降に有意な低下を認めた。内視鏡的萎縮度別にはいずれの群でも同様に組織学的萎縮、腸上皮化生の改善を認めた。内視鏡的萎縮度は除菌後改善する症例も見られたが、有意なスコアの改善は見られなかった。

【結語】除菌後の経時的な長期観察で胃粘膜の炎症、萎縮、腸上皮化生の改善を認めた。これより、胃癌リスクの高い背景粘膜の改善により胃癌予防の可能性が示唆された。

MLST および次世代シーケンサーを使用したアジア株の解析

大分大学医学部 環境・予防医学¹⁾

大分大学医学部 総合診療部²⁾

○鈴木留美子¹⁾ 松成修¹⁾²⁾ 塩田星児¹⁾²⁾ 花田克浩¹⁾ 綿田雅秀¹⁾²⁾ 松田みゆき¹⁾ 高橋彩華¹⁾ 岩谷駿¹⁾ 松尾祐一¹⁾ Tran, Binh Thanh¹⁾ 山岡吉生¹⁾

Helicobacter pylori は、*cagA* タンパクのタイプの違いが胃癌の発症リスクに関連することが知られている。*cagA* 陰性株、および Western *cagA* を持つ株は胃ガンのリスクが低く、東アジア型 *cagA* を持つ株は胃ガンのリスクが高い。中国、韓国、日本などで見られる株はほとんどが東アジア型の *cagA* を持つが、本研究室での先行研究から、沖縄で採取されたサンプルには強毒性の東アジア型 *cagA* とは異なる Western *cagA* を持つ株や、*cagA* を持たない *cagA* 陰性株が本土より高頻度に見られ、これが沖縄での胃ガン発症率の低さに寄与しているのではないかと予測された。

本研究室では、これらの株が戦後流入した欧米株の影響によるものであるか、あるいはもともと沖縄の株は本土株と異なるタイプであったのか、MLST(multi-locus sequence typing)による解析に加えて、次世代シーケンサーによる塩基配列データを利用した解析を行った。

MLST は細菌のタイピングに広く使われる手法であり、ピロリ菌では7つのハウスキーピング遺伝子（菌の生存に必要な生合成反応を担う基本的遺伝子）の部分塩基配列をつなげたものが使用される。MLST に基づく系統解析により、ピロリ菌はアフリカに分布する3グループ（hp-Africa1, hp-Africa2, hp-NEAfrica）、ヨーロッパのグループ（hp-Europe）、インドから東南アジアにかけて分布するグループ（hp-Asia2）、オーストラリア・ニューギニアのグループ（hp-Sahul）、東アジアを中心とした広い範囲のモンゴロイドに見られるグループ（hp-EastAsia）に分類することができる。さらに hp-EastAsia は、台湾からニュージーランドにかけて分布する hsp-Maori、先史時代にベーリング海峡を経由して南北アメリカ大陸に渡ったモンゴロイドと共に移動した hsp-Amerind、東アジアの hsp-EAsia の3つのサブグループに分けられる。

中国、韓国、日本などで見られるピロリ菌はほとんどが hsp-EAsia に属し、強毒性の東アジア型 *cagA* を持っている。本研究室では日本本州の株と沖縄株に

ついて、*cagA* のタイピングと系統解析を行った。MLST 配列による系統樹では、沖縄で採取された Western *cagA* 株と *cagA* 陰性株は互いに異なる位置を示し、クラスタリング手法を使用した集団構造解析でも、これら 2 つのグループは別個の集団として認識された。また、*cagA* 陰性株は系統的に東アジアのサブグループである hsp-Maori に近いが、Western *cagA* 株はインドから東南アジアにかけて見られる hp-Asia2 グループに近いことが示唆された。

Western *cagA* は hp-Asia2 株にも見られるが、沖縄株の Western *cagA* に関しては、hp-Asia2 由来である可能性の他に、在住欧米人のピロリ菌と東アジアタイプの菌の多重感染により遺伝子が混じり合った結果である可能性も考えられる。そこでさらに我々は、沖縄株を含めヨーロッパと東アジアの中間に位置するいくつかの株について、次世代シーケンサーで読みとった塩基配列から 900 以上の遺伝子を推定し、欧米株の遺伝子の影響を受けている可能性のある遺伝子を除いた系統樹を作成した。

その結果、たとえばペルー原住民から採取された株のゲノムは、元の株の遺伝子と欧米株の遺伝子がモザイク状になっていることが示唆されたが、沖縄の欧米型 *cagA* 株のゲノムは全体的に Asia2 グループに近いことがわかった。沖縄における欧米型 *cagA* 株と *cagA* 陰性株は、古代にアジア大陸から沖縄に移入してきた人類集団に由来するものである可能性が高い。これらの結果はピロリ菌と疾病の関連だけでなく、日本列島への人の移動の歴史にも光を当てるものである。