

山梨県の散発下痢症患者由来サルモネラの 細菌・疫学的検討 (1999年)

野田 裕之 浅川 洋美 泉谷 秀昌* 金子 通治

Epidemiological and Bacteriological Studies on
Salmonella Strains Isolated from Patients
with Sporadic Diarrhea in Yamanashi Prefecture (1999)

Hiroyuki NODA, Hiroyoshi ASAKAWA, Hidemasa IZUMIYA
and Michiharu KANEKO

はじめに

サルモネラによる食中毒は1989年以降わが国で急増し、1992年には患者数、事件数とも第1位となり¹⁾、以後サルモネラは常に食中毒原因菌の上位を占めている。サルモネラ食中毒増加の原因として鶏卵のサルモネラ・エンテリティディス (*Salmonella* serovar Enteritidis, 以下SEと略す) 汚染が以前から指摘され²⁾、SE食中毒の原因食品として卵及び卵加工品によることが多数報告されている³⁾。ここ数年、厚生省は卵によるサルモネラ食中毒防止のための対策を講じているが、サルモネラ食中毒は依然として減少していないという現状にある。

さらに、1999年3月、川崎市でイカ菓子によるサルモネラ食中毒が発生した。その後、サルモネラに汚染されたイカ乾製品を原因とする食中毒患者が全国で多数(最終患者数1,634名)発生し、大きな問題となった³⁾。イカ乾製品からは*S. Oranienburg* (以下SOと略す) *S. Chester* (以下SCと略す) の2つの血清型のサルモネラが分離され、比較的まれな血清型で起こったこと、イカ乾製品という過去に例を見ない食品が原因であったこと、全国各地の散発的な食中毒や下痢症が実はひとつの広域的な食中毒事例、いわゆる diffuse outbreak であったことなどが注目された。

当所では、サルモネラ食中毒を未然に防止するため、1985年以降山梨県内のサルモネラ症の原因血清型を中心に分離株の諸性状を検討してきた⁴⁻¹¹⁾。本県でもSEによる食中毒、下痢症が数多く発生し、また、1999年には下痢症からSO、SCも分離されている。

今回、1999年に山梨県内で分離された散発下痢症株について、月別分離頻度、患者の年齢・性別および血清

型、薬剤感受性、フェージ型、プラスミドプロファイルなどの疫学マーカーを検討したので報告する。

材料および方法

1. 供試菌株

1999年1月から12月までの1年間に山梨県内の7つの医療・検査機関からサルモネラの同定依頼を受けた283株を供試した。

2. サルモネラの同定法

サルモネラの同定は常法¹²⁾に従い、生化学的および血清学的性状検査からサルモネラと同定するとともに、その血清型を決定した。

3. 薬剤感受性試験法

NCCLS法の規格に準拠し、一濃度ディスク法(BBLセンシディスク)によって測定した。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

KadoとLiuの方法¹³⁾に準拠し、実施した。プラスミドDNAを抽出後、0.65%のアガロースを使用し、約2

* : 国立感染症研究所

表1 サルモネラ 283 株の血清型と月別分離状況 (1999 年)

血清型	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	合計
S. Enteritidis	3	3	3	6	6	12	26	46	24	31	20	12	192
S. Oranienburg		4	7	8	1		1	1					22
S. Typhimurium		1	1	1			4	3	4	2	3		19
S. Braenderup					1					7		1	9
S. Thompson				1	2			1	1		1		6
S. Saintpaul							2	3	1				6
S. Chester	1	1	1	2									5
S. Litchfield		1								2			3
S. Stanley										1	1	1	3
S. Schleissheim		1						1					2
S. Infantis						1			1				2
S. Hadar								1	1				2
S. Champaign			1										1
S. Johannesburg					1								1
S. Montevideo							1						1
S. Livingstone								1					1
S. Isangi								1					1
S. Virchow								1					1
S. Muenchen								1					1
S. Newport									1				1
S. Heidelberg											1		1
S. Chailey											1		1
O9:H-					1								1
O4:d:-									1				1
合計	4	11	13	18	12	13	34	60	34	43	27	14	283

時間 30 分電気泳動してエチジウムブロマイドで染色後、紫外線照射下で撮影し、プラスミドを観察した。

5. ファージ型別

SE のファージ型 (PT) 別は国立感染症研究所・細菌部に依頼した。

結果および成績

1. 分離株の血清型と月別分離株数

1999 年に山梨県内で分離された散発下痢症由来のサルモネラは 283 株で、これまで最多の 1996 年 305 株に次ぐ分離株数であった。それらは表 1 に示すように 22 種類の血清型に分類された。最も多く分離されたのは 1989 年以降流行している SE で、192 株 (67.8%) であった。次いで SO が 22 株 (7.8%)、S. Typhimurium が 19 株 (8.2%) と続き、5 株以上分離された血清型は S. Braenderup 9 株、S. Thompson 6 株、S. Saintpaul 6 株、SC 5 株であった。表 2 に上記 7 つの血清型の 1995 年からの分離状況を示した。1999 年には SO、S. Braenderup、S. Saintpaul、SC が目立って分離された。分離月も SO が 2~4 月、S. Braenderup が 10 月、S. Saintpaul が 7~9 月、SC が 1~4 月と偏っていた。1999 年に山梨県でヒトから初めて分離された血清型として S. Schleissheim、S. Livingstone、S. Muenchen があった。また、S. Johannesburg は 5 月に集団食中毒事例¹⁴⁾が発生しており、その関連

と推測される 1 株が分離された。

月別分離株数は、表 1 のように 8 月が 60 株 (21.2%) と最も多く、次いで 10 月 43 株 (15.2%)、7 月、9 月 34 株 (12.0%) と続き、7~10 月で全体の約 60% を占めた。しかし、1 月を除く他の月は 10 株以上と比較的均等に分離されてもいた。

表 2 1999 年に 5 株以上分離された血清型の 1995 年からの分離状況

血清型	1995年	1996年	1997年	1998年	1999年	計
S. Enteritidis	111	266	170	144	192	883
S. Oranienburg	3	2	1	0	22	28
S. Typhimurium	8	10	12	16	19	65
S. Braenderup	1	0	1	1	9	12
S. Thompson	3	4	4	5	6	22
S. Saintpaul	0	1	1	2	6	10
S. Chester	0	0	0	1	5	6
others	25	22	39	24	24	134
合計	151	305	228	193	283	1,160

2. 年齢・性別の分離頻度

表 3 にサルモネラが分離された 283 人の年齢・性別の分離頻度を 10 歳間隔で示した。0~9 歳までの乳幼児、小児から最も多く分離され、124 人と 43.8% を占めた。次いで、10~19 歳が 43 人 (15.2%)、20~29 歳が 34 人 (12.0%) と続き、30 歳代から 70 歳代は 6% 以下でほとんど同じ分離数であった。性別では男 149 人 (52.7%) に対し女 134 人 (47.3%) と男からの分離例がやや多かった。

表3 サルモネラ散発下痢症患者の年齢・性別分布

性	年 齢 群 (歳)									合 計 (%)
	0~9	10~19	20~29	30~39	40~49	50~59	60~69	70~79	>80*	
男	60	27	17	8	8	8	11	8	2	149 (52.7)
女	64	16	17	9	5	9	5	8	1	134 (47.3)
合 計 (%)	124 (43.8)	43 (15.2)	34 (12.0)	17 (6.0)	13 (4.6)	17 (6.0)	16 (5.7)	16 (5.7)	3 (1.1)	283

* 最高齢：男 83 歳，女 89 歳 (いずれも Enteritidis)

表4 サルモネラ散発下痢症患者 9 歳以下の年齢・性別分布

性	年 齢 (歳)										合 計 (%)
	0*	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
男	5	7	10	7	5	11	3	4	2	6	60 (48.4)
女	5	8	12	8	7	7	5	5	5	2	64 (51.6)
合 計 (%)	10 (8.1)	15 (12.1)	22 (17.7)	15 (12.1)	12 (9.7)	18 (14.5)	8 (6.5)	9 (7.3)	7 (5.6)	8 (6.5)	124

* 最低齢：男女とも 7 ヶ月児 (いずれも Enteritidis)

年齢群で分離数の多かった 0~9 歳の乳幼児，小児の 1 歳ごとの分離頻度を表 4 に示した。2 歳児で 22 人 (17.7%) と最も多く，以下 5 歳児 18 人 (14.5%)，1 歳児および 3 歳児 15 人 (12.1%) と 1~5 歳での分離数が多かった。

3. 分離株の薬剤感受性

表 5 に分離株の血清型別耐性率を示した。1999 年に分離された 283 株のうち，使用した 18 種類の薬剤のいずれかに耐性を示したのは 169 株で，耐性率は 59.7% であった。耐性率は 1996 年⁹⁾ 83.6%，1997 年⁹⁾ 75%，1998 年¹⁰⁾ 66.3% と年々低下していた。SE は 192 株のうち 144 株 (75%) が耐性で，SE の耐性率も 1996 年⁹⁾ 89%，1997 年⁹⁾ 86.5%，1998 年¹⁰⁾ 77.1% と低下していた。5 株以上分離された血清型のうち SO，S. Thompson，S. Saintpaul，SC はすべて感受性株であった。分離数は少ないが，S. Stanley，S. Infantis，S. Hadar 等は分離株すべてが耐性を示した。

表 6 に分離株の薬剤に対する耐性率を示した。SM が 56.9% と耐性率は最も高かったが，1996 年⁹⁾ の SM の耐性率 82.3% から顕著に低下していた。以下 TC 9.2%，SA 8.1%，DOXY 7.1% 等の順で高かった。CEX，CFX，LMOX，NFLX，FOX，CTX，CPFX の 7 剤に対しては耐性を示した株はなかった。

表5 分離株 (283 株) の血清型別耐性率

血 清 型	分離株数	耐性株数	耐性率 (%)
S. Enteritidis	192	144	75.0
S. Typhimurium	19	12	63.2
S. Braenderup	9	3	33.3
S. Stanley	3	3	100
S. Litchfield	3	1	33.3
S. Infantis	2	2	100
S. Hadar	2	2	100
S. Chailey	1	1	100
O9: H-	1	1	100
Sensitive	51	0	0
合 計	283	169	59.7

表6 分離株 (283 株) の各種薬剤に対する耐性率

薬 剤	耐性株数	耐性率 (%)
SM	161	56.9
TC	26	9.2
SA	23	8.1
DOXY	20	7.1
KM	13	4.6
ABPC	12	4.2
CP	11	3.9
NA	6	2.1
ST	6	2.1
TMP	6	2.1
GM	1	0.4

表7 耐性株(169株)の耐性型と血清型

耐性型	株数(%)	血清型(株数)
SM	139 (82.2)	S. Enteritidis (138) O9:H- (1)
SA	1 (0.6)	S. Braenderup (1)
TC	1 (0.6)	S. Typhimurium (1)
KM	1 (0.6)	S. Typhimurium (1)
NA	1 (0.6)	S. Enteritidis (1)
SM・TC・DOXY	2 (1.2)	S. Enteritidis (1) S. Hadar (1)
SA・SM・TC・DOXY	5 (3.0)	S. Enteritidis (3) S. Infantis (1) S. Litchfield (1)
SA・TC・KM・DOXY	2 (1.2)	S. Enteritidis (1) S. Hadar (1)
SA・SM・TC・KM	1 (0.6)	S. Infantis (1)
SA・SM・ABPC・NA	1 (0.6)	S. Typhimurium (1)
SA・TC・CP・KM	1 (0.6)	S. Typhimurium (1)
SA・SM・TC・CP・ABPC・NA	3 (1.8)	S. Typhimurium (3)
SA・SM・TC・KM・ABPC・DOXY	3 (1.8)	S. Braenderup (2) S. Chailey (1)
SA・TC・CP・KM・ABPC・DOXY	2 (1.2)	S. Typhimurium (2)
SA・SM・TC・CP・ST・TMP・DOXY	3 (1.8)	S. Stanley (3)
SA・TC・CP・KM・ABPC・ST・TMP・DOXY	1 (0.6)	S. Typhimurium (1)
SA・SM・TC・CP・KM・ABPC・ST・TMP・DOXY	1 (0.6)	S. Typhimurium (1)
SA・SM・TC・KM・GM・ABPC・NA・ST・TMP・DOXY	1 (0.6)	S. Typhimurium (1)

4. 耐性株 169 株の耐性型と血清型

表7に耐性株 169 株の耐性型と血清型を示した。SM1 剤耐性型が 139 株と耐性株の 82.2%を占めたが、うち 138 株(81.7%)が SE であった。これを SE の耐性型としてみると表5の SE 耐性株数 144 株のうち、SM1 剤耐性が 138 株(95.8%)とほとんどであり、例年⁸⁻¹⁰⁾と同様な成績であった。使用薬剤を今回から 6 剤増やしたこともあり、多剤耐性の薬剤数が増加していたが、特に 6 剤以上の耐性を示した血清型は、S. Typhimurium, S. Stanley, S. Braenderup, S. Chailey であった。

5. SE のプラスミドプロファイルとフェージ型

散発下痢症から分離された SE 192 株について、プラスミドプロファイルとフェージ型を検討した。

SE のプラスミドは、表8に示したように 60kb 単独保有が 173 株(90.1%)とほとんどであった。ほかは、60, 40kb, 88, 60kb, 60, 55kb, 100, 60kb 保有株であった。

表9に 1999 年を含め、最近 5 年間の SE のフェージ型を示した。1999 年も例年と同様に PT4 が 128 株(66.7%)と最も多かった。次いで PT1 が 31 株(16.1%)で、PT4 と PT1 で 80%以上を占めたが、PT4 と PT1 以外のフェー

表8 S. Enteritidis (192 株) のプラスミドプロファイル

プラスミドプロファイル(kb)	株数	%
60	173	90.1
60, 40	7	3.6
88, 60	5	2.6
60, 55	4	2.1
100, 60	2	1.0
-	1	0.5

ジ型が 8 種類と例年になく多種であった。なお、PT34 は 1989 年から 1991 年にかけて流行し、1992 年を最後に分離されていなかったが⁶⁾、7 年ぶりに 3 株分離された。

6. 3 種類の疫学マーカーのパターン

表10に SE の疫学マーカーであるフェージ型、薬剤耐性型、プラスミドプロファイルの相互関係と株数を示した。SE 192 株は 26 のパターンに分類された。最も多いパターンは PT4, SM1 剤耐性, 60kb プラスミド単独保

有で 81 株 (42.2%) であった。次いで PT4, 薬剤感受性, 60kb プラスミド単独保有が 39 株 (20.3%), PT1, SM1 剤耐性, 60kb プラスミド保有が 27 株 (14.1%) と多かった。PT34, SM1 剤耐性, 60, 55kb プラスミド保有というパターンは以前流行した⁶⁾ 代表的なパターンであった。

考 察

山梨県内で散発下痢症から分離されるサルモネラは, 1985 年以降最も多かった 1996 年⁸⁾ の 305 株を最高に

表9 最近5年間の散発下痢症患者由来SEのフェージ型分布

年	フェージ型																		事例数
	1	4	4a	5	5a	6	6a	7	7a	8	9	9a	12	21	34	47	UT	RDNC	
1995	30	47	—	22	—	—	—	—	—	3	—	1	—	—	—	—	8	—	111
1996	29	196	—	1	1	—	—	31	—	—	2	1	—	—	—	—	5	—	266
1997	37	118	—	—	—	—	—	—	1	—	1	—	3	—	—	—	10	—	170
1998	17	108	—	—	1	—	—	—	—	—	—	—	—	2	—	—	7	9	144
1999	31	128	1	—	1	1	2	7	2	—	—	—	—	—	3	1	4	11	192
合計	144	597	1	23	3	1	2	38	3	3	3	2	3	2	3	1	34	20	883

表10 S.Enteritidis (192株) のフェージ型, 薬剤耐性型, プラスミドプロファイル

フェージ型	薬剤耐性型	プラスミドプロファイル (kb)	株数 (%)
4	SM	60	81 (42.2)
	Sensitive	60	39 (20.3)
	NA	60	1 (0.5)
	Sensitive	88, 60	2 (1.0)
	SM	88, 60	1 (0.5)
	Sensitive	60, 40	3 (1.6)
1	SM	60, 40	1 (0.5)
	SA・SM・TC・DOXY	60	27 (14.1)
	SM	60	3 (1.6)
7	SM	—	1 (0.5)
	SM	60	7 (3.6)
3 4	SM	60, 55	3 (1.6)
	SM	60, 55	3 (1.6)
6 a	SM・TC	100, 60	1 (0.5)
	SM・TC・KM	100, 60	1 (0.5)
7 a	SM	60	1 (0.5)
	SM	60, 40	1 (0.5)
4 a	SM	88, 60	1 (0.5)
5 a	SM	88, 60	1 (0.5)
6	Sensitive	60	1 (0.5)
4 7	Sensitive	60	1 (0.5)
UT	SM	60	3 (1.6)
	SM	60, 55	1 (0.5)
RDNC	SM	60	6 (3.1)
	Sensitive	60	3 (1.6)
	SM	60, 40	1 (0.5)
	Sensitive	60, 40	1 (0.5)

1997年⁹⁾の228株、1998年¹⁰⁾の193株と年々減少傾向を示していたが、1999年は前年¹⁰⁾より90株多い283株が分離され、1996年に次ぐ分離株数であった。近年の最多分離血清型であるSEも、1999年は192株と1996年⁹⁾の226株に次いで多く分離された。また、SE以外のサルモネラの分離数も1996年の39株に対して91株と多く、1999年はSE以外のサルモネラも多く分離された年でもあった。

SE以外で多く分離された血清型はSO, *S. Typhimurium*, *S. Braenderup*, *S. Thompson*, *S. Saintpaul*, SCであった。このうち*S. Typhimurium*は1989年以降毎年第2位に分離される血清型であり¹¹⁾、また、*S. Thompson*も1995年から年に3~5株分離されていたが、その他は1999年に目立って分離された血清型であった。

特にSOは22株も分離され、分離月も2~4月に偏っており、これは全国的に発生したイカ乾製品による食中毒と同時期であった。また、SCも1~4月に5株分離され、イカ乾製品との関連性が考えられた¹⁵⁾。

今回のSOのように過去の分離状況から考えて、ある特定の血清型が散発下痢症から異常に多く分離された場合には同一の食品による食中毒(diffuse outbreak)である可能性が考えられる。散発下痢症の血清型や発生状況を監視し、これらの成績を行政に反映することにより、食中毒の発見や拡大防止につながるものが改めて認識された。

月別では、7~10月に全体の60%と最も多く分離され、前年¹⁰⁾と同様な傾向であった。気温の高い夏期はもちろんのこと、気温の低下がみられる秋口や体力が低下するといわれる初秋にも食品の温度管理等取扱いには注意が必要である。また、1月を除くすべての月で10株以上が分離されたことは、複数の汚染食品の存在も考えられた。

患者は9歳以下が43.8%を占め、特に2歳を中心に1~5歳の乳幼児に多かった。乳幼児の患者が多いのは、調査を始めた1985年からの傾向であり⁵⁻¹⁰⁾、これは乳幼児のサルモネラに対する感受性が高いためと思われる。小児は成人に対する菌数よりもはるか少数の菌量でも発症する¹⁶⁾とされているので、乳幼児に対しては卵などの生食を避ける、十分に加熱調理するなど衛生管理の徹底が必要である。

全分離株の薬剤耐性率は1996年から1999年まで年々低下していた。しかし、1999年のSEの耐性率は1998年とほとんど同じ75%であった。耐性型ではSEのSM1剤耐性が138株と依然として多く、耐性株の81.7%を占め、SE耐性株の95.8%であった。薬剤に対する耐性率は、SMが56.9%と最も高かったが、1996年⁹⁾の82.3%と比較すると顕著に低下していた。この原因としてSM1剤耐性がほとんどを占めるSEの耐性率が14%低下した

こと、SE以外の他の血清型株に感受性菌が多かったことなどが考えられた。

フェージ型はPT4が66.7%、PT1が16.1%と、2つのフェージ型で80%以上を占め、流行が続いていた。しかし、他のフェージ型も8種類と多くみられ、多型化がうかがわれた。また、PT34という1989年⁹⁾に流行がみられた型が7年ぶりに3株分離され、他のフェージ型同様今後注目していく必要がある。SEのプラスミドは60kb単独保有がほとんどであり、例年と変化がみられなかった。

3種類の疫学マーカーの組合せで1999年の傾向をみると、PT4、SM1剤耐性、60kbプラスミド単独保有という従来のタイプのSEが前年¹⁰⁾より低下したものの依然として流行していた。PT1、SM1剤耐性、60kbプラスミド単独保有は、1998年¹⁰⁾は7株であったのが、1999年は27株と急増し、本疫学マーカー株の汚染食品の流通も推測された。このように3種類の疫学マーカーには流行している組合せパターンがあり、年によって増減もみられるが、数株しか分離されないまれなパターンも多数存在した。松根ら¹⁷⁾は、SEのdiffuse outbreakについての報告の中で、疫学マーカーがフェージ型RDNC、ABPC・SM耐性、60、2.5、1.5kbプラスミド保有とまれなパターンだったので、スクリーニングの際疫学マーカーとして有用だったと述べている。3種類の疫学マーカーを確認することは、集団食中毒発生時の疫学的基礎資料として有効と考えられた。

散発下痢症のほとんどは家庭内で起きていると推測され、原因食品を追求することは困難であるが、SEが多数分離されることから、鶏卵の関与が疑われる。厚生省では卵による食中毒防止の一環として「家庭における卵の衛生的な取扱いについて」を策定している。これを踏まえ、消費者への普及啓蒙活動を積極的に行うことが大切である。

文 献

- 1) 厚生省生活衛生局食品保健課：食品衛生研究，43 (7)，105~132 (1993)
- 2) 中村明子：食品衛生研究，41 (7)，17~28 (1991)
- 3) 品川邦汎：日食微誌，17 (1)，43~47 (2000)
- 4) 金子通治：感染症誌，65，1533~1540 (1991)
- 5) 金子通治：感染症誌，69，1294~1301 (1995)
- 6) 金子通治，中村明子：感染症誌，70，792~800 (1996)
- 7) 金子通治：山梨衛公研年報，39，39~44 (1995)
- 8) 高橋照美，金子通治：山梨衛公研年報，40，17~20 (1996)
- 9) 金子通治：山梨衛公研年報，41，22~26 (1997)

- 10) 野田裕之ら：山梨衛公研年報, 42, 25~32 (1998)
- 11) 浅川洋美ら：山梨衛公研年報, 42, 33~39 (1998)
- 12) 厚生省監修：微生物検査必携細菌・真菌検査, 第3版, p.D43~D54, 日本公衆衛生協会, 東京 (1987)
- 13) Kado, C. I. & Liu, S. T. : J. Bacteriol., 145, 1365~1373 (1981)
- 14) 浅川洋美ら：山梨衛公研年報, 43, 21~25 (1999)
- 15) 浅川洋美ら：山梨衛公研年報, 43, 30~33 (1999)
- 16) 田村和満, 坂崎利一：食水系感染症と細菌性食中毒, P. 88~89, 中央法規出版, 東京, 1991
- 17) 松根 渉ら：日食微誌, 16 (4), 237~243 (1999)