

# 山梨県内河川水から分離したサルモネラの細菌学的検討 (1998～2001)

大沼正行 野田裕之 浅川洋美 金子通治

Isolation of *Salmonella* from River Water in Yamanashi Prefecture (1998～2001)

Masayuki OHNUMA, Hiroyuki NODA, Hiroyoshi ASAKAWA and Michiharu KANEKO

## はじめに

サルモネラは、発熱、下痢、腹痛を主徴とする急性胃腸炎の原因菌である。1989年より *Salmonella* Enteritidis を中心としたサルモネラによる食中毒が激増し、現在でもサルモネラによる食中毒は事件数、患者数とも常に上位を占めている。とくに1992年からは死者の発生が報告され、サルモネラによる食中毒は、その数だけでなく症状の重篤さにおいても十分注意しなければならない。このことから、ヒトからの分離状況は無論のこと、食品や生活環境のサルモネラ汚染についても、その実態を把握するため各地で調査研究が行われてきた<sup>1-3)</sup>。我々も、山梨県内のサルモネラ食中毒を予防するための基礎資料を得る目的で、ヒトの下痢症及び河川水由来のサルモネラについて報告してきた<sup>4-6)</sup>。

今回は、1998年4月から2001年3月までの3年間に分離された山梨県内河川水由来のサルモネラについて分離状況、血清型別および菌株の性状を報告する。

## 材料及び方法

### 1. 材料及び調査期間

採水地点は、前報<sup>6)</sup>と同様に県内10地点を選び(図1)、毎月1回、11の河川水を採水し、試料とした。調査期間は1998年4月から2001年3月までの3年間である。

### 2. サルモネラの分離、定量および同定法

サルモネラの分離は既報<sup>4)</sup>と同様に、11の河川水に10%塩化第二鉄溶液を1ml加え、一晚静置しフロック形成後、上清を吸引除去し、フロックを2倍濃度のSBGスルファ培地を用い42°Cで24および48時間増菌培養し、SSB培地で分離培養を行った。

サルモネラの定量は既報<sup>5)</sup>と同様に、砂田橋、濁川橋、

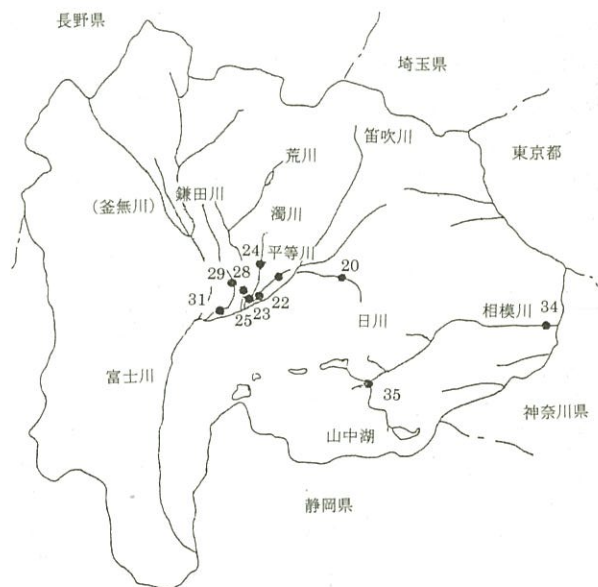


図1 採水地点

二川橋の3地点について、11の試料の一部を用いEEMブイオンを使用したMPN法により行った。

サルモネラの同定法は常法に従い、生化学的性状および血清学的性状検査からサルモネラと同定し、その血清型を決定した。

### 3. 薬剤感受性試験

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。使用した薬剤は前報<sup>6)</sup>のスルフィソキサゾール(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)、ノフロキサシン(NFLX)、ナリジクス酸(NA)、スルファメトキサゾールとトリメトプリムの合剤(ST)の12薬剤にホスホマイシン(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) の6薬剤を加えた18薬剤である。

#### 4. プラスミドプロファイル

プラスミドDNAの抽出は既報<sup>7)</sup>と同様に, KadoおよびLiuの方法<sup>8)</sup>に準じて行った。0.65%のアガロースゲルで約2時間の電気泳動を行い, 解析した。

### 結果および考察

#### 1. 採水地点別サルモネラ分離状況

採水地点別サルモネラ分離状況を表1に示した。各地点とも試料数は36である。全試料360検体中121検体(34%)からサルモネラが分離された。サルモネラの分離頻度が高かった地点は濁川砂田橋と鎌田川流末で23検体64%の分離率で, 鎌田川高室橋が21検体58%, 濁川濁川橋が16検体44%, 平等川流末が12検体33%と続いた。最も少なかったのは日川葡萄橋の1検体3%で

表1 採水地点別のサルモネラ分離状況

No.	河川名	採水地点	試料数	分離数	(%)
20	日川	葡萄橋	36	1	(2.8)
22	平等川	平等橋	36	6	(16.7)
23	平等川	平等川流末	36	12	(33.3)
24	濁川	砂田橋	36	23	(63.9)
25	濁川	濁川橋	36	16	(44.4)
28	濁川	二川橋	36	4	(11.1)
29	鎌田川	高室橋	36	21	(58.3)
31	鎌田川	鎌田川流末	36	23	(63.9)
34	相模川	桂川橋	36	4	(11.1)
35	宮川	昭和橋	36	11	(30.6)
合計			360	121	(33.6)

あった。分離率の高かった濁川砂田橋と鎌田川流末のうち濁川砂田橋は前報<sup>6)</sup>においても最も高い分離率(69%)であり, 分離率の低かった日川葡萄橋は前報<sup>6)</sup>につづいて低い分離率(3%)であった。前報<sup>6)</sup>と比較すると全体の分離率に変化は見られなかったが, 採水地点別にみると変動がみられ, 平等川流末, 濁川橋, 昭和橋は分離率が減少し, 平等橋, 鎌田川流末, 桂川橋は上昇していた。

#### 2. 月別, 水温別サルモネラ分離状況

図2に月別のサルモネラ分離地点数と平均水温を示した。サルモネラの分離地点数は9月が18地点(サルモネラ分離率16%)と最も高く, 3月が6地点(サルモネラ分離率5%)と最も低い分離地点数であった。平均水温についてみると季節変動が顕著で, 7月が27.4℃で最も高く, 1月が6.6℃で最も低い水温であった。サルモネラ分離地点数は水温の高い8, 9月に多く, 水温の低

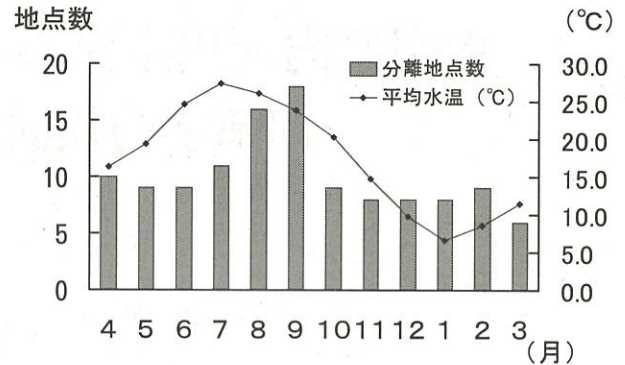


図2 月別の平均水温とサルモネラ分離地点数

下した冬季は少なかった。この結果は, サルモネラ分離率は水温による影響が大きいとする報告<sup>9)</sup>と同様の結果であった。

#### 3. 河川水由来サルモネラの血清型

3年間に分離されたサルモネラの血清型を採水地点別に表2に示した。分離株数は152株で27種類の血清型(不明分除く)に分類された。最多血清型は*S. Nagoya*で分離株数は37株(24%)であった。以下, 分離株数が10株以上になった血清型は*S. Enteritidis*が24株(16%), *S. Tennessee*が11株(7%), *S. Oranienburg*が10株(7%), *S. Infantis*が10株(7%)であった。過去3回の調査で分離されず今回はじめて分離された血清型は, *S. Albany*, *S. Istanbul*, *S. Kentucky*, *S. Saintpaul*, *S. Schleissheim*の5種類であった。

*S. Tennessee*は分離された11株中8株(72%)が昭和橋から分離され, 前報<sup>6)</sup>22株中19株(82%), 既報<sup>5)</sup>35株中29株(83%)と同様の傾向にあった。*S. Infantis*は既報<sup>5)</sup>では分離された6株のうち1株(17%)が平等川流末から, 前報<sup>6)</sup>では16株中9株(56%)が同採水地点から, 今回は10株中9株(90%)と年々平等川流末から分離される割合が増加していたが, 1999年10月の検体以降分離されていない。これは, 生活排水や下水道, と畜場排水等の衛生環境の整備, 改善が原因として考えられ, 今後検討を加えたい。*S. Braenderup*は1999年の11月~3月に濁川から集中的に分離された。これは, 同時期に県内で発生した*S. Braenderup*による散発下痢症の増加と一致しており<sup>9)</sup>, 本血清型菌の株間のDNAパターンによる解析を試みる必要がある。*S. Oranienburg*についても既報<sup>10)</sup>のとおり, 散発下痢症患者からの分離時期とほぼ同時期に河川水からも分離されており, 株間の相異をあわせて検討したい。*S. Typhimurium*は1980~1983年調査で12%, 1986~1989年調査で10%, 1995~1998年調査で7%, 今回が2%と年々減少傾向にあった。

表2 河川水から分離したサルモネラの血清型と採水地点別の分離状況

O群	血清型	20 日川	22 平等川 平等橋	23 平等川 流末	24 濁川 砂田橋	25 濁川 濁川橋	28 荒川 二川橋	29 鎌田川 高室橋	31 鎌田川 流末	34 相模川 桂川橋	35 宮川 昭和橋	分離 株数	
O4	Agona	1						2		1		4	
	Chester				2			2	2			6	
	Derby					1						1	
	Paratyphi B		1									1	
	Saintpaul							2				2	
	Schleissheim								1			1	
	Typhimurium		1		1				1			3	
	Stanley				1								1
	O4:HNM								1				1
O7	Tennessee					1				2	8	11	
	Infantis			9		1						10	
	Oranienburg		1		1	2	3	1	2			10	
	Thompson			1	3	2		1	1			8	
	Braenderup				5	2						7	
	Mbandaka				1			1				2	
	Montevideo					1						1	
	Singapore									1		1	
	O7:HNM								1		1	2	
O8	Nagoya		1		11	4	1	8	12			37	
	Albany					1						1	
	Hadar				1							1	
	Istanbul							1				1	
	Kentucky								1			1	
	Litchfield			1								1	
	Newport					1						1	
	O8:HNM								1			1	
O9	Enteritidis		2	1	4	3		5	6		3	24	
	O9:f,g,m,t					1						1	
	O9:HNM					1						1	
O1,3,19	Senftenburg				1	1					2		
O13	Havana				1				1			2	
	O13:y								1			1	
O18	Cerro							1			1		
O35	O35:HUT										1	1	
OUT	OUT:1,5,r				1							1	
	OUT:1,5,r,z <sub>13</sub>				1							1	
	OUT:1,w,d							1				1	
分離株数・計		1	6	12	34	22	4	27	29	4	13	152	

#### 4. 分離株の薬剤感受性

分離されたサルモネラについて薬剤感受性試験を行った。その結果、使用した18薬剤いずれかに耐性を示したのは152株中46株(30%)で前報<sup>9)</sup>(46%)より耐性率が下がっていた。そのうち多剤耐性を示したのは26株(17%)であった。表3に血清型別の耐性株の耐性株数と分離株数5株以上の血清型について耐性率を示した。最多血清型のS. Nagoyaは前報<sup>9)</sup>では耐性株が分離されたが今回は分離された37株すべてが感受性であった。耐性率が高いのはS. Enteritidis(71%), S. Infantis(100%), S. Braenderup(86%)であった。この3株のうちS. EnteritidisとS. Infantisはヒト下痢症由来株においても耐性率が高く<sup>9)</sup>、前報<sup>9)</sup>と同様の結果であっ

表3 河川水からの分離株の血清型別薬剤耐性株数

O群	血清型	分離株数	耐性株数(%)
O4	Typhimurium	3	1
O7	Tennessee	11	1 (9)
	Infantis	10	10 (100)
	Thompson	8	1 (13)
	Braenderup	7	6 (86)
O8	Istanbul	1	1
	Hadar	1	1
	O8:HNM	1	1
O9	Enteritidis	24	17 (71)
	O9:f,g,m,t	1	1
O13	Havana	2	2
O18	Cerro	1	1
O35	O35:HUT	1	1
	OUT:1,5,r	1	1
	OUT:1,5,r,z <sub>13</sub>	1	1

た。表4に薬剤耐性型と、その耐性型をもつ血清型、株数を示した。耐性型は16パターンに分類されSM単剤耐性型が46株中18株(39%)と最も多かった。これは*S. Enteritidis*のSM1剤耐性株の分離率が高かったため(15株33%)であり、前報<sup>6)</sup>と同様の結果であった。各薬剤別の耐性率はSM 91%、TC 57%、KM 33%の順であり、割合は異なるがヒト下痢症由来株と同様の傾向<sup>11)</sup>にあった。

表4 河川水から分離した株の薬剤耐性型と血清型

薬剤耐性型	株数(%)	血清型	(株数)
SM	18	Enteritidis	(15)
		Tennessee	(1)
		Cerro	(1)
		O35:HUT	(1)
TC	1	Thompson	(1)
NA	1	Enteritidis	(1)
SM,TC	3	Istanbul	(1)
		Enteritidis	(1)
TC,KM	1	OUT:1,5,r	(1)
		Infantis	(1)
SA,SM,TC	2	Infantis	(1)
		OUT:1,5,r,z13	(1)
SM,TC,KM	2	Infantis	(2)
		Infantis	(4)
SA,SM,TC,KM	4	Infantis	(4)
SA,SM,TC,DOXY	1	Infantis	(1)
SA,TC,CP,KM	1	Typhimurium	(1)
SA,SM,TC,CP,DOXY	2	Havana	(2)
SA,SM,TC,KM,DOXY	1	Infantis	(1)
SA,SM,TC,ABPC,DOXY	1	Braenderup	(1)
SM,KM,NA,GM,ABPC	1	O9:f,g,m,t	(1)
SM,TC,KM,ABPC,DOXY	5	Braenderup	(5)
SA,SM,TC,ST,DOXY,TMP	2	Hadar	(1)
		O8:HNM	(1)

## 5. プラスミドプロファイル

上位血清型の*S. Nagoya*, *S. Enteritidis*, *S. Tennessee*, *S. Oranienburg*, *S. Infantis*についてプラスミドの検討を行った。その結果、*S. Nagoya*は37株中9株、*S. Enteritidis*は24株中23株、*S. Infantis*は10株中10株プラスミドを保有していた。プラスミドプロファイルは血清型によって異なり*S. Nagoya*は9株すべて49kb付近に単独のプラスミドを、*S. Enteritidis*は前報<sup>6)</sup>同様60kb単独保有株が21株と最も多く、60, 94.5kb保有株が2株であり、*S. Infantis*はすべて200kb以上のプラスミドを単独保有していた。*S. Tennessee*, *S. Oranienburg*はすべての株においてプラスミドの保有がみられなかった。

以上のことから、*S. Nagoya*や*S. Enteritidis*は薬剤感受性や生化学的性状の相異から起源の異なる複数の株が分離されていることが考えられたが、*S. Tennessee*, *S. Infantis*は今回は図示しなかったが、パルスフィールド電気泳動法の結果、同一パターンが得られ長期間に

わたって同一の汚染源と思われる菌が分離されたと考えられた。

## 6. MPN法によるサルモネラの定量

大腸菌群の定量試験で利用するMPN法に準拠し、EEMブイオンを用いた3本法によって砂田橋、濁川橋、二川橋の3地点についてサルモネラの定量を行った。その結果、2000年5月の砂田橋の1検体のみ陽性となり、4MPN/100ml、血清型は*S. Stanley*であった。*S. Stanley*は同一検体の定性試験からも分離された。

定量試験を行った3地点について既報<sup>5)</sup>と比較すると定性試験の分離率は既報<sup>5)</sup>が12~88%に対し今回は11~64%とやや既報<sup>5)</sup>の分離率が高く、定量試験の分離率を比べると既報<sup>5)</sup>では3~62%に対し今回の3河川は0~3%であった。このことから河川水に含まれるサルモネラの菌数は以前に比べ減少している可能性が示唆された。

## ま と め

1. 河川水検査試料数360検体中サルモネラが分離されたのは121検体34%であった。
2. サルモネラの分離頻度が高かった地点は濁川砂田橋と鎌田川流末であった。
3. 8~9月にかけてサルモネラ分離率が高く、それぞれ14%、16%の分離率を示し、水温の低下した冬季は分離率が低かった。
4. 河川水から分離されたサルモネラは152株で27種類の血清型に分類された。最多血清型は*S. Nagoya*で次いで*S. Enteritidis*, *S. Tennessee*, *S. Oranienburg*, *S. Infantis*が上位血清型であった。
5. 薬剤に対する耐性率は30%でそのうち多剤耐性を示したのは17%であった。耐性パターンは16種類に分類され、*S. Enteritidis*のSM1剤耐性株の分離率が高かったため、とくにSM単剤耐性が多く分離された。
6. 上位血清型のうちプラスミドを保有していたのは*S. Nagoya*37株中9株(24%)、*S. Enteritidis*24株中23株(96%)、*S. Infantis*10株中10株(100%)であり、*S. Tennessee*, *S. Oranienburg*は保有がみられなかった。
7. 薬剤感受性やプラスミドプロファイル、生化学的性状などから*S. Enteritidis*, *S. Nagoya*は起源の異なる複数の株が、*S. Tennessee*, *S. Infantis*は同一起源の株が、それぞれ分離されたと考えられた。
8. 河川水中のサルモネラの定量を試みたが、陽性となったのは2000年5月の砂田橋の1検体のみで4MPN/100mlであった。

最後に試料の河川水を採水していただいた県薬剤師会  
環境衛生センターの方々に深謝いたします。

## 文 献

- 1) 山脇徳美, 斎藤志保子, 森田盛大: 秋田県衛生科学  
研究所報, 30, 57~61 (1986)
- 2) 山田三紀子ら: 横浜衛研年報, 31, 131~136 (1992)
- 3) 稲木裕美ら: 群馬県衛生環境研究所報, 25, 76~85  
(1993)
- 4) 金子通治: 日本公衛誌, 31, 227~233 (1984)
- 5) 金子通治ら: 山梨衛公研年報, 32, 20~25 (1988)
- 6) 高橋照美, 植松香星, 金子通治: 山梨衛公研年報,  
41, 33~37 (1997)
- 7) 金子通治: 感染症誌, 65, 1533~1540 (1991)
- 8) Kado, C. I. & Liu, S. T.: J. Bacteriol., 145,  
1365~1373 (1981)
- 9) 野田裕之ら: 山梨衛公研年報, 43, 14~20 (1999)
- 10) 浅川洋美, 野田裕之, 金子通治: 山梨衛公研年報,  
43, 30~33 (1999)
- 11) 松下 秀ら: 感染症誌, 75, 116~123 (2001)