

山梨県における最近3年間(1990~1992年)の 散発下痢症患者由来サルモネラ血清型 エンテリティディスの疫学的検討

金子 通治

Epidemiological Studies on *Salmonella* Serovar Enteritidis Isolated
from Patients with Sporadic Cases of Diarrhea in 1990-1992

Michiharu KANEKO

はじめに

1989年、全国でサルモネラ血清型エンテリティディス(以下、*S. Enteritidis*)による食中毒および散発下痢症が急増した¹⁻³⁾。それまでの分離頻度第1位はサルモネラ血清型ティフィウムであった⁴⁾が、その年以降血清型エンテリティディスが首位の座を占めている。また、1960年に腸炎ビブリオが食中毒統計に記載されて以来、食中毒事件の第1位は腸炎ビブリオによることがほとんどであったが、1992年は初めてサルモネラが首位になった。腸炎ビブリオによる食中毒の減少が大きな要因であるが、*S. Enteritidis*による食中毒の増加も大きな原因の1つであろうと思われる。

山梨県における1989年の*S. Enteritidis*の分離頻度は全国同様に前年を大きく上回り、最多であった。この年の分離頻度、諸性状についてはすでに報告^{3,5)}した。県内の散発下痢症患者由来の*S. Enteritidis*は、1990年に前年の約半数、さらに1991年はまたその半数と減少傾向にあったが、1992年は1989年に次いで多く分離された。そこで今回は、サルモネラ食中毒予防上の基礎的疫学資料を提供する目的で、最近3年間(1990~1992年)に分離された*S. Enteritidis*の諸性状を疫学的に検討したので報告する。

材料および方法

1. 供試菌株

1990~1992年の3年間に、県内の6つの医療施設

(県立中央病院、市立甲府病院、甲府共立病院、巨摩共立病院、富士吉田市立病院、山梨厚生病院)および甲府市医師会臨床検査センターから計327株のサルモネラの同定および血清型別の依頼を受けた。そのうち、*S. Enteritidis*と同定した131株(1990年54株、1991年21株、1992年56株)を供試した。

2. サルモネラ同定法

サルモネラの同定は常法⁶⁾に従い、生化学的および血清学的性状検査を行いサルモネラと決定した。

3. 薬剤感受性試験

11種類の薬剤、すなわちスルフィソミジン(SA)、ストレプトマイシン(SM)、クロルテトラサイクリン(CTC)、ドキシサイクリン(DOXY)、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)およびナリジキシン酸(NA)について、最小発育阻止濃度(MIC)を測定した。測定法および薬剤濃度はすでに報告⁷⁾した方法によった。薬剤耐性菌と判定した薬剤濃度はSAはMIC 800 μ g/ml以上、他の10薬剤はMIC 50 μ g/ml以上である。また、一部の株については、NCCLS法の規格に準拠した一濃度ディスク法(Kirby-Bauer法)によった。ディスクはサルファ剤はスルフィソキサゾール、テトラサイクリンはオキシテトラサイクリンである他は前述の薬剤と同じである。

4. フェージ型別

131株の*S. Enteritidis*のフェージ型別は、国立予防衛生研究所フェージ型別室に依頼した。

5. プラスミドプロファイル

プラスミドプロファイルは既報⁹⁾と同様に実施した。すなわち、Kado および Liu の方法⁹⁾に準じプラスミドDNA抽出後、0.6%アガロースゲルで100V、2時間30分電気泳動し、エチジウムブロマイドで染色した後、紫外線照射下で撮影した。プラスミドの大きさは、対照菌株に*S. Enteritidis* L156 (200, 60, 1.4Kb)⁹⁾および*Escherichia coli* NR-1/K-12 (94.5Kb)¹⁰⁾を用いて測定した。

結果および成績

1. *S. Enteritidis*の月別、年次別分離状況

*S. Enteritidis*の年次別分離状況を他の主要血清型とともに1988年から表1に示した。すでに報告した1989年の分離株数は最も多く112株であった。しかし、1990年はその約半数の54株、さらに1991年は21株と減少し1989年の約20%になり、*S. Enteritidis*の流行も終息するかにみえた。しかし、1992年は1990年同様の56株が分離され、再び増加した。しかも、*S. Enteritidis*の占める割合が52.8%で、1989年の47.1%を上回り、過去最高の分離率であった。他の血清型をみると、1989年以降*S. Typhimurium*は*S. Enteritidis*に次いで第2位となっている。*S. Hadar*および*S. Blockley*は減少傾向にあった。とくに、*S. Blockley*は顕著であった。

表2に、1990～1992年の3年間に分離された327株を131株の*S. Enteritidis*および他の血清型株196株に分けて示した。各月は3年間の合計の分離株数である。

表2 *S. Enteritidis*の3年間(1990～1992:累計)の月別分離株数

血清型	1月	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	合計
<i>S. Enteritidis</i>	2 (1.5)	2 (1.5)	10 (7.6)	3 (2.3)	5 (3.8)	4 (3.1)	15 (11.5)	19 (14.5)	23 (17.6)	26 (19.8)	9 (6.9)	13 (9.9)	131 (100)
他の血清型	2 (1.0)	6 (3.1)	14 (7.1)	14 (7.1)	11 (5.6)	12 (6.1)	21 (10.7)	48 (24.5)	21 (10.7)	25 (12.8)	11 (5.6)	11 (5.6)	196 (100)
合計	4 (1.2)	8 (2.4)	24 (7.3)	17 (5.2)	16 (4.9)	16 (4.9)	36 (11.0)	67 (20.5)	44 (13.5)	51 (15.6)	20 (6.1)	24 (7.3)	327 (100)

()内は1～12月までの*S. Enteritidis*、他の血清型の合計数に対するその月の占める率

表1 サルモネラ主要血清型の年次別分離状況

(由来:散発下痢症)

血清型	1988年	1989	1990	1991	1992	合計
<i>Typhimurium</i>	19	34	17	18	12	100
<i>Paratyphi B</i>	4	10	5	4	1	24
<i>Oranienburg</i>	18	0	0	13	3	34
<i>Litchfield</i>	7	4	4	1	6	22
<i>Hadar</i>	11	14	9	10	4	48
<i>Blockley</i>	0	25	7	4	1	37
<i>Enteritidis</i>	4	112	54	21	56	247
その他	22	39	26	28	23	138
合計	85	238	122	99	106	650

表中の%はそれぞれ131株、196株に対するその月の占める割合である。*S. Enteritidis*は10月に最も多く分離され、26株、19.8%を占めた。次いで9月、8月、7月の順でいずれも10%以上を占めていた。他の血清型株は8月が最も多く、48株で24.5%を占めた。*S. Enteritidis*および他の血清型株いずれも7～10月までの4ヶ月間がそれぞれ10%以上を占め、夏季から秋口にかけて分離率が高かった。

2. 散発下痢症患者の年齢、性別分布

*S. Enteritidis*が分離された131人の年齢、性別を検討したのが表3である。表4は、分離率が最も高かった9才以下の年齢群について1才ごとの分布をみたものである。表3に示した各年齢群では、すでに報告^{3,5)}した年齢分布と同様に9才以下の群が最も高く、51.1%であった。性別も前の報告同様男からの分離率が高かった。9才以下の1才ごとの分布においても、2才児の率が最も高く19.4%、次いで4才児、16.4%と分布のパターンは前報と同一であった。

表3 S. Enteritidis による散発下痢症患者の年令、性別分布 (1990~1992)

性	年 令 群 (歳)								合 計 (%)
	0-9	10-19	20-29	30-39	40-49	50-59	60-69	70-79	
男	38	19	5	4	3	2	3	1	75 (57.3)
女	29	12	2	2	4	1	2	4	56 (42.7)
合 計 (%)	67 (51.1)	31 (23.7)	7 (5.3)	6 (4.6)	7 (5.3)	3 (2.3)	5 (3.8)	5 (3.8)	131

表4 S. Enteritidis による散発下痢症患者 (9歳以下) の年令、性別分布

性	年 令 (歳)										合 計 (%)
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
男	2	5	7	3	8	2	6	3	1	1	38 (56.7)
女	4	2	6	3	3	4	2	1	2	2	29 (43.3)
合 計 (%)	6 (9.0)	7 (10.4)	13 (19.4)	6 (9.0)	11 (16.4)	6 (9.0)	8 (11.9)	4 (6.0)	3 (4.5)	3 (4.5)	67

3. 薬剤感受性

表5に1988年からの成績を示した。1990年は、S. Enteritidis 54株のうち49株、90.7%がSM1剤耐性株であった。翌1991年も株数こそ少ないもののSM1剤耐性株は、90.4%で前年と同様であった。1992年のSM1剤耐性株の占める割合は、その前2年より低かったものの76.8%であった。1989年のS. Enteritidisの流行以来、いずれの年もSM1剤耐性株が多いという大きな特徴は変わらなかった。

4. フェージ型 (PT)

年次別のフェージ型を表6に示した。S. Enteritidisが流行し始めた1989年は、PT34が70.5%と最多であったが、1990年はPT34に代わってPT4が54株のS. Enteritidisのうち、30株、55.6%を占め最も多かった。また、PT14、PT20が1株ずつ初めて分離された。1991年はPT4、PT34の2つのPTに分類されたのみで、再び1989年と同じ傾向であった。しかし、1992年はPT4が最多で1990年と同様であるが、PT34は大きく減少し、7.5%となり、1990年とはこの点で大きく異なった。この年の最も大きな特徴は、今までみられなかったPT、すなわちPT1が1985年からの散発下痢症患者由来のサルモネラ調査以来初めて出現し、20株、

表5 S. Enteritidis の年次別薬剤耐性型

耐 性 型	1988年	1989	1990	1991	1992	合計
感 受 性	3	21	2	2	10	38
SM		82	49	19	43	193
SA・SM・TC		5			3	8
SA・SM・ABPC		1				1
SM・TC・ABPC			1	1		2
NA	1	2				3
SA・SM			2			2
合 計	4	112	54	21	56	247

37.7%を占めたことである。PT1株が出現したのは、1992年7月初旬で24才、男性由来株であり、SA・SM・TC耐性パターン、60Kbプラスミド単独保有株であった。1989年までPT8型株が毎年分離されていたが、1990年からは全くPT8型株の分離がみられなくなるといふ特徴もあった。

5. プラスミドプロファイル

薬剤感受性、フェージ型と同様、1988年からの成績を表7に示した。1990年は60Kbプラスミド単独保有株が26株と最も多かったが、60・55Kbプラスミド保有株も21株で大きな差はなかった。しかし、1991年は60・55Kbプラスミド保有株が21株中16株、76.2%を占めた。これは次の項にも一部示したが、PTとの関連、すなわちPT4、PT34の分離株数と同じであり、PT4は60Kbプラスミド単独保有株、またPT34は60・55Kbプラスミド保有株であるという結果の現われであった。また、1992年は分離株56株のうち、52株、92.9%が60Kbプラスミド単独保有株であるという特徴がみられた。これもPT1型株が60Kbプラスミド単独保有の結果であった。

6. 各疫学マーカー間の相互関係

フェージ型とプラスミドプロファイルの間に関連がみられることはすでに報告³⁾した。また、このことは田口らも指摘¹¹⁾している。S. Enteritidisの薬剤感受性、フェージ型およびプラスミドプロファイルの主要な性状について相互関係を検討したのが表8である。既報³⁾と同様、SM1剤耐性または感受性株でPT4型株は60Kbのプラスミドを単独保有し、SM1剤耐性、PT34型株は60・55Kbのプラスミドを保有しているという特徴がみられた。1992年に20株のPT1型株が出現したが、プラスミドはすべて60Kb単独保有であった。いずれのPTもSM1剤耐性株が多かったが、PT1型株はSA・SM・TCの3剤耐性株が3株みられた。また、現在分離株の検討を続けているなかでもSA・SM・TC耐性株が多く、これらはおそらくPT1で、60Kbプラスミド単独保有株である可能性が大きいと推測できる。

考 察

1989年に全国で流行したS. Enteritidisによる食中毒および散発下痢症は依然として続いており、その報告が数多くなされている。県内において1992年3月に発生した学校給食によるS. Enteritidis食中毒についても報告したところである。食中毒の原因食品は鶏卵に関連した食品の事例が多く¹⁾、鶏卵のサルモネラ汚染がいわれ、それも輸入種鶏によるとも推測されている。

県内でもS. Enteritidisの分離が続いており、今回は1990～1992年に分離された散発下痢症患者由来株131株についてその性状を疫学マーカーを中心に検討した。

1990年、1991年と減少傾向をみせたS. Enteritidisは再び増加した。また、月別の分離頻度を検討したが、

表6 S. Enteritidisの年次別フェージ型 (PT)

PT	1988年	1989	1990	1991	1992*	合計
1					20	20
4		23	30	5	29	87
8	1	8				9
13	1					1
14			1			1
20			1			1
34		79	21	16	4	120
RDNC	1					1
UT	1	2	1			4
合計	4	112	54	21	53	244

*1992年の分離株56株のうち3株は未実施

表7 S. Enteritidisの年次別プラスミドプロファイル

プラスミド*	1988年	1989	1990	1991	1992	合計
60	2	28	26	5	52	113
60, 55		71	21	16	3	111
94.5, 60, 55		5			1	6
100, 60, 55		2				2
その他	2	6	7			15
合計	4	112	54	21	56	247

*66Kbのプラスミドは60Kbのプラスミドに加算した

表8 S. Enteritidis主要株のフェージ型、プラスミドプロファイルおよび薬剤耐性型の関係

フェージ型	プラスミドプロファイル (Kb)			薬剤耐性
	60	60・55	94.5・60・55	
PT 1	14	0	0	
PT 4	52	0	0	SM
PT 34	1	39	1	

PT 1	3	0	0	
PT 4	7	0	0	感受性
PT 34	0	0	0	

PT 1	3	0	0	SA・SM・TC

その結果10月が最も高い分離率であった。他の血清型株は8月であり、異なっていた。*S. Enteritidis*による食中毒例は冬季を除き、夏季以外の他のシーズンにも発生しており、食品衛生面からも十分な注意が必要であろう。年令別では、既報³⁾と同様2才児が最も多いという成績であった。

薬剤感受性の結果では、SM1耐性株が各年とも高率であり、SM1耐性株が多いという特徴に変化はなかった。PTは1989年ほどPT34はみられなくなってきたが、PT4、PT34は分離される頻度の高いPT株であった。1992年は、PT4が29株(54.7%)と最も多かったが、PT1も20株(37.7%)分離されたのが目立った。1992年の集団発生例の報告³⁾をみると、山梨県の散発例と同様PT1がPT4に次いで多く分離されていた。PTに関してみると、おそらく全国の集団発生例の株と、県内の散発例の株は同一であると推定できる。プラスミドは、1991年の分離株を除いて、60Kb単独保有株が多く、とくに1992年は56株中52株、92.9%が60Kbプラスミド単独保有株であった。これは以前にも指摘³⁾したが、PTとプラスミドプロファイルに関連性があり、PT34(60・55Kbプラスミド保有)が減少した結果であると考えられる。また、新たに分離されたPT1型20株すべてが60Kbプラスミド単独保有株であったこともその要因である。以上のことから*S. Enteritidis*については、3つの疫学マーカーである薬剤感受性、ファージ型およびプラスミドプロファイルを調べ、それらの相互関係を検討する必要があり、今回もその意義が認められた。現在のPT1型株の増加の原因は不明であるが、原因食品等や分離株の性状をさらに追究する必要があると考える。

*S. Enteritidis*による食中毒、散発下痢症は依然として続いており、今後も注目、監視していかなければならない。全国でも本食中毒予防のための疫学的資料が数多く報告¹³⁻¹⁷⁾されている現状にあるが、今後も食品、とくに鶏卵を使用した調理等の取り扱いを含め、食品調理従事者への新たな啓蒙、衛生思想の普及の継続が必要である。

謝辞： 稿を終るにあたり、*S. Enteritidis*のファージ型別をしていただいた国立予防衛生研究所ファージ型別室長の中村明子博士およびプラスミド測定の対照菌株を分与して下さった東京医科歯科大学の堀内三吉博士に深謝致します。

文 献

- 1) 中村明子：食品衛生研究，41(7)，17～28(1991)
- 2) 国立予防衛生研究所，厚生省保健医療局疾病対策課 結核・感染症対策室：病原微生物検出情報，14，1～2(1993)
- 3) 金子通治：感染症誌，65，1533～1540(1991)
- 4) 工藤泰雄：モダンメディア，37，265～277(1991)
- 5) 金子通治，植松香星：山梨衛公研年報，33，34～38(1989)
- 6) 田村和満：微生物検査必携細菌・真菌検査，第3版(厚生省監修)，p.D-43～D-54，日本公衆衛生協会，東京(1987)
- 7) 金子通治，植松香星：感染症誌，64，612～619(1990)
- 8) Kado, C.I. & Liu, S. T. : J. Bacteriol., 145, 1365～1373(1981)
- 9) Nakamura, M., et al : Infect. Immun., 47, 831～833(1985)
- 10) Womble, D. D. & Rownd, R. H. : Microbiol. Rev., 52, 433～451(1988)
- 11) 田口真澄ら：感染症誌，66，1067～1074(1992)
- 12) 金子通治ら：山梨衛公研年報，35，38～41(1992)
- 13) 塩沢寛治ら：食品と微生物，5，113～120(1988)
- 14) 大中隆史ら：堺市衛研年報，8，81～86(1990)
- 15) 八嶋 務ら：栃木衛研年報，21，43～49(1991)
- 16) 松下 秀ら：感染症誌，66，327～339(1992)
- 17) 樋口淑美ら：群馬県衛環研年報，24，55～62(1992)