

山梨県内河川水から分離したサルモネラの血清型と薬剤感受性について(1995～1998)

高橋照美*¹ 植松香星*² 金子通治

Serovars and Drug Susceptibility of *Salmonella*
Isolated from River Water in Yamanashi Prefecture (1995～1998)

Terumi TAKAHASHI, Kousei UEMATSU and Michiharu KANEKO

はじめに

近年、細菌性食中毒のうちサルモネラによる食中毒事例の占める割合は増加傾向にある。特に *S. Enteritidis* は厚生省生活衛生局食品保健課から「腸管出血性大腸菌 O157 及びサルモネラ・エンテリティディス発生状況について」が事務連絡で各都県市等の食品衛生主管課あて逐次知らされており、動向が注目されている。

一方、環境中からのサルモネラの分離については国立感染症研究所発行の「病原微生物検出情報」に全国の状況が毎月報告されている。

山梨県においても、サルモネラ食中毒等を予防するための基礎資料を得る目的で、これまでに河川水由来のサルモネラについてその性状および河川ごとの分離頻度等を報告してきた^{1, 2)}。

今回は1995年から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、その血清型および薬剤感受性を中心に検討を加えたので報告する。

材料および方法

1. 材料および調査期間

公共用水域水質測定地点の中から、過去2回の調査結果^{1, 2)}に基づき10箇所の採水地点を選び(図1)、毎月1回、約1ℓを採水し試料とした。調査は1995年5月から1998年3月までの約3年間、各地点とも延べ35回行った。

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¹⁾と同様に、1ℓの河川水に10%塩化第二鉄溶液を1ml加え、フロックを形成させ、このフロックを2倍濃度のSBGスルファ培地を用い42℃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。

砂田橋、濁川橋、二川橋の3地点については1ℓの試料の一部(33.3ml)を用い既報²⁾と同様に、EEMブイオンを使用したMPN法(3本法)により定量を試みた。

分離されたサルモネラの同定は常法³⁾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。使用薬剤は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)、セフォキシム(CFX)、ラタモキシフ(LMOX)、ノルフロキサシン(NFLX)、ナリジクス酸(NA)および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薬剤である。

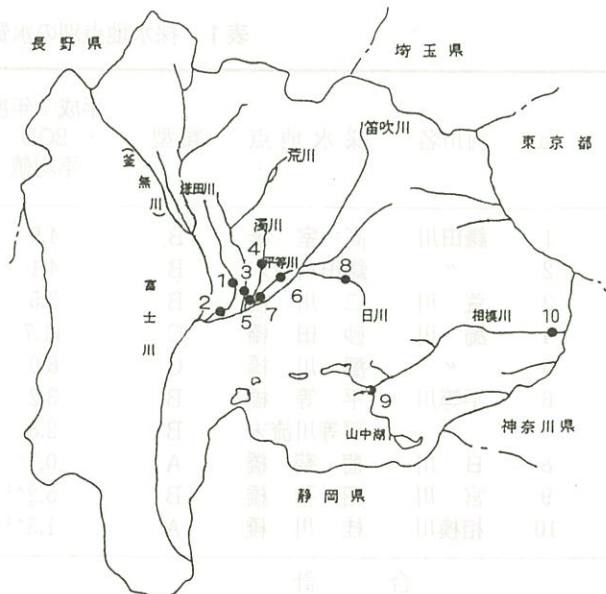


図1 採水地点

* 1 : 現 吉田保健所 * 2 : 現 甲府保健所

4. プラスミドプロファイルとフェージ型別

分離された *S. Enteritidis* についてプラスミドプロファイルとフェージ型別を検討した。

プラスミド DNA の抽出は、既報⁴⁾と同様に Kado および Liu の方法⁵⁾に準じて行った。0.65% のアガロースを使用し、約 2 時間の電気泳動後、エチジウムブロマイドによってゲル中の DNA を染色し、紫外線照射下で撮影した。

フェージ型は、国立感染症研究所腸内細菌フェージ型別センターに依頼した。

結果および考察

1. 採水地点別のサルモネラ陽性率

表 1 に、各地点のサルモネラ陽性数と過去 2 回(1986~89 年調査:以下 86 年調査, 1980~83 年調査:以下 80 年調査)の調査の陽性数を示した。

各採水地点ともサルモネラが分離され、延べ 35 回の調査において最も陽性数の多かったのは、濁川砂田橋の 24 回、陽性率 69%であった。次いで同河川下流の濁川橋、鎌田川高室橋の 20 回、陽性率 57%が続いた。最も少なかったのは平等川平等橋、日川葡萄橋の 1 回、陽性率 3%であった。

各地点陽性率を過去 2 回の調査と比較すると、86 年調査では前回の 80 年調査に比べ陽性率が低下した高室橋、砂田橋、平等川流末は今回の調査ではその陽性率が上昇していた。濁川橋では調査ごとに陽性率が高くなっていた。また宮川昭和橋、相模川桂川橋は、過去 2 回の調査に比べて陽性率が低下傾向にあった。

表 1 に各地点の水質状況⁶⁾もあわせて示した。公共用

水域は環境基本法により生活環境を保全するうえで維持することが望ましい基準(環境基準)が決められている。この基準はその水域ごとに類型指定されており、河川水では水質の pH, BOD, 浮遊物質量, DO, 大腸菌群数により A A~E 類型の 6 段階に分けられている。例えば大腸菌群数は、A A 類型では 50MPN/ml 以下, A 類型 1,000 MPN/ml 以下, B 類型 5,000MPN/ml 以下, C~E 類型では基準無し、と決められている。今回採水を行った地点は A 類型の葡萄橋、桂川橋から C 類型の砂田橋、濁川橋まで水質状況は広い範囲となっていたが、B, C 類型の地点は県内河川の中では比較的生活排水等の影響を受けている地点である。各地点の陽性率はこれらの類型や BOD の平均値とよく一致しており、汚濁の進んだ地点では陽性率も高い傾向にあった。

なお、全体の陽性率は 34%で 80 年調査の 37%に比べ低かったが、86 年調査とは同程度であった。

2. 分離されたサルモネラの血清型

分離された 142 株の血清型とその分離株数を採水地点別に表 2 に示した。血清型は 31 種(不明分は除く)に分類され最多血清型は過去 2 回の調査と同様に *S. Tennessee* で 23 株、16%であった。次いで *S. Nagoya* の 19 株、13%, *S. Infantis* の 16 株、11%, *S. Enteritidis* の 14 株、10%, *S. Typhimurium* の 10 株、7%の順であった。1989 年から食中毒、散発下痢症等で急増している現在の流行血清型である *S. Enteritidis* は 80 年調査で 3 株、86 年調査では 2 株しか分離されなかった。しかし今回の調査ではこれまで *S. Tennessee* に次いで分離数の多かった *S. Typhimurium* よりも多く分離され流行を反映していた。

過去 2 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. Brandenburg*, *S. Virchow*, *S. Montevideo*,

表 1 採水地点別の水質状況とサルモネラ分離状況

No.	河川名	採水地点	類型	平成 7 年度 BOD 平均値	1995.5	1986.6	1980.7
					~1998.3 陽性数(%) n = 35	~1989.3 陽性数(%) n = 34	~1983.7 陽性数(%) n = 36
1	鎌田川	高室橋	B	4.9	20 (57.1)	13 (38.2)	17 (47.2)
2	"	鎌田川流末	B	4.1	15 (42.9)	15 (44.1)	12 (33.3)
3	荒川	二川橋	B	3.5	6 (17.1)	9 (26.5)	7 (19.4)
4	濁川	砂田橋	C	11.7	24* ² (68.6)	15 (44.1)	21* ⁴ (60.0)
5	"	濁川橋	C	6.0	20 (57.1)	16 (47.1)	14 (38.9)
6	平等川	平等橋	B	3.2	1 (2.9)	4 (11.8)	3 (8.3)
7	"	平等川流末	B	2.8	13 (37.1)	7 (20.6)	21* ⁴ (60.0)
8	日川	葡萄橋	A	0.7	1 (2.9)	1* ³ (3.0)	0
9	宮川	昭和橋	B	5.2* ¹	18 (51.4)	30 (88.2)	27* ⁴ (77.1)
10	相模川	桂川橋	A	1.3* ¹	2 (5.7)	7 (20.6)	10* ⁴ (28.6)
合 計					120 (34.4)	117 (34.5)	132 (37.1)

* 1 : COD, * 2 : n = 34, * 3 : n = 33, * 4 : n = 35

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	分離株数	鎌田川		荒川	濁川		平等川		日川	宮川	相模川
			高室橋	流末	二川橋	砂田橋	濁川橋	平等橋	流末	葡萄橋	昭和橋	桂川橋
O4	Typhimurium	11	7	2			1		1			
	Brandenburg	2					1		1			
	Paratyphi B	1					1					
	Kiambu	1							1			
	Agona	1							1			
	O4:HUT	1					1					
O7	Tennessee	23			1	2	1				19	
	Infantis	16		1		2	3		9			1
	Thompson	8	1			5	2					
	Oranienburg	3	2		1							
	Virchow	2			2							
	Bareilly	2		1		1						
	Montevideo	1				1						
	Singapore	1				1						
	Livingstone	1				1						
	Mbandaka	1					1					
	Mikawasima	1									1	
	O7:HUT	3		1		1	1					
O8	Nagöya	19	4	5	1	6	3					
	Newport	4	2	1			1					
	Hadar	3				1	1					1
	Litchfield	2		1	1							
	Kottbus	2				1	1					
	Chailey	1					1					
	Muenchen	1				1						
	Bovismorbificans	1					1					
	Skansen	1	1									
	O9	Enteritidis	14	4	1		3	4			1	
O13	Havana	3		1			1			1		
	Poona	1							1			
O3, 10	Muenster	3				2	1					
	Uganda	3	2						1			
O1, 3, 19	Senftenberg	1		1								
	OUT:y,1,7	2	1				1					
	OUT:z ₄ ,z ₂₃	1					1					
	OUT:b:en,x	1								1		
分離株数・計		142	24	15	6	30	25	1	15	1	22	2
血清型数(不明分を除く)		31	8	9	5	14	14	1	7	1	3	2

S.Singapore, S.Livingstone, S.Mbandaka, S.Mikawasima, S.Kottbus, S.Chailey, S.Bovismorbificans, S.Skansen, S.Poona, S.Muenster の 13 種類の血清型であった。逆に 86 年調査で比較的多く分離された S.Chester, S.Bredeney は今回分離されなかった。

地点別の分離株の血清型をみると分離株数の多かった濁川の砂田橋、濁川橋ではともに 14 種類の血清型株が分離されていた。このうち S.Nagoya, S.Enteritidis 等 9 種類の血清型株が両地点から分離された。同様の傾向は鎌田川の流末と高室橋においてもみられ、S.Typhimurium, S.Nagoya 等の血清型株が共通に分離されていた。

地点ごとの特徴は、昭和橋では S.Tennessee が 22 株中 19 株を占めこれまでと同様の傾向を示していた。また平等川の流末では今回 7 種類の血清型、15 株が分離されたが、S.Infantis が 9 株を占めていた。このように地点特有の血清型についてはその周辺地域からの諸要因によるサルモネラの流入も考えられ、今後の検討課題である。

なお、S.Tennessee は、これまで昭和橋、桂川橋などの相模川水系でしか分離されていなかったが、今回の調査では二川橋、砂田橋、濁川橋の 3 地点でも分離されたのが大きな特徴であった。

3. 薬剤に対する耐性株の割合と血清型

142 株のうち使用した 12 薬剤のいずれかに耐性を示したのは 65 株で、耐性率は 46% であった。表 3 に血清型別の耐性株の割合を示した。分離された 31 種類の血清型のうち 13 種類が耐性を示し、不明分 6 種類 8 株のうち 3 種類 3 株も耐性を示した。比較的分離株数の多かった血清型をみると S.Tennessee, S.Nagoya では耐性率がそれぞれ 43, 32% とやや低かったが、S.Infantis では 88%, S.Enteritidis は 86%, S.Typhimurium も 80% と非常に高かった。S.Infantis の耐性率はこれまでの散発下痢症患者由来の株の 31%⁷⁾ と比較すると高い傾向を示しており、河川水由来株の特徴であった。

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。SM 1 剤耐性型が 30 株で耐性株全体の 46% と最も高かった。血清型では S.Enteritidis, S.Tennessee, S.Nagoya が多かった。次いで多かった耐性型は SA・SM・TC 耐性型で、S.Infantis, S.Enteritidis などにみられた。また S.Infantis, S.Typhimurium は多剤耐性型を示す株が多かった。S.Enteritidis における SM 1 剤耐性型、S.Typhimurium の多剤耐性型の多い傾向は、これまでの散発下痢症患者由来のサルモネラの特徴⁷⁾ と一致していた。

各薬剤ごとの耐性率は、表 4 の耐性パターンで SM の占める頻度が高く 59 株に耐性がみられ、耐性率が 42% となっていた。次いで TC 23%, SA 22% の順であった。

なお、CET, CFX, LMOX, NFLX に対しては耐性を示した株はなかった。

表 3 河川水からの分離株の血清型別耐性株数

○群	血清型	分離株数	耐性株数
O 4	Typhimurium	11	8
	Paratyphi B	1	1
	Kiambu	1	1
	O 4 : HUT	1	1
O 7	Tennessee	23	10
	Infantis	16	14
	Thompson	8	2
	Virchow	2	2
	O 7 : HUT	3	1
O 8	Nagoya	19	6
	Hadar	3	2
	Litchfield	2	2
	Chailey	1	1
O 9	Enteritidis	14	12
O 3, Muenster 10		3	1
	OUT : Z ₄ , Z ₂₃	1	1

表 4 河川水から分離した 142 株のうちの耐性 65 株の耐性型と血清型

耐性型	株数(%)	血清型(株数)
SM	30(46.2)	Enteritidis (10)
		Tennessee (10)
		Nagoya (6)
		Thompson (2)
		Muenster (1)
		OUT : Z ₄ , Z ₂₃ (1)
TC	1(1.5)	Kiambu (1)
NA	1(1.5)	O 4 : HUT (1)
SM・TC	1(1.5)	Hadar (1)
SA・SM・TC	10(15.4)	Enteritidis (2)
		Infantis (4)
		Paratyphi B (1)
		Typhimurium (2)
		O 7 : HUT (1)
SA・TC・KM	1(1.5)	Infantis (1)
SA・SM・CP	2(3.1)	Litchfield (2)
SM・TC・NA	1(1.5)	Hadar (1)
SA・SM・TC・KM	8(12.3)	Infantis (8)
SA・TC・CP・ST	2(3.1)	Virchow (2)
TC・CP・KM・ABPC	1(1.5)	Typhimurium (1)
SA・SM・TC・CP・ABPC	4(6.2)	Typhimurium (4)
SA・SM・TC・KM・ABPC	1(1.5)	Chailey (1)
SA・SM・TC・KM・NA	1(1.5)	Infantis (1)
SA・SM・TC・CP・KM・ABPC	1(1.5)	Typhimurium (1)

表5 S.Enteritidis 14株の薬剤耐性型とプラスミドとフェージ型

薬剤耐性型(株数)	プラスミド	フェージ型(株数)
感受性	(2) 60kb	PT 4 (1),PT28 (1)
SM	(10) 60kb	PT 1 (2), PT 4 (5), UT (1),RDNC (1)
SA・SM・TC	(2) 60kb	PT 1 (1), RDNC (1)

4. プラスミドプロファイルとフェージ型

分離されたS.Enteritidis 14株についてプラスミドとフェージ型別の検討を行った。プラスミドプロファイルはフェージ型(P.T), 薬剤耐性型等と同様に広く疫学マーカーとして利用され, 相互関係が報告されている^{8,9)}。そこで今回の結果を薬剤耐性型別に表5に示した。今回の14株は, プラスミドはすべて60kb単独保有株であった。このうちPTはPT 4, SM 1 剤耐性型が6株を占め, ここ数年流行している疫学マーカーと一致していた。

5. 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ブイヨンを用いた3本法によって砂田橋, 濁川橋, 二川橋の3地点について定量を試みた。これら3地点は, 表1に示したように定性的な分離は陽性率が69~17%と高かったが, 今回定量で陽性となったのは1996年5月の砂田橋1回のみで7MPN/100mlであった。各地点とも同一試料1ℓからは定性的に分離されており, 用いた試料の量的な違い, 分離に用いた培地の違いもあるが, 定量の結果からは100ml中に存在する確率はほとんど無いと考えられた。

1996年のO157, サルモネラなどによる食中毒の多発により, 水域においてサルモネラ等の環境基準を決める動きもある。今回の結果から定量的にはB, C類型においても分離されない場合が多かったことから, 分離法等の検討が重要と考えられ, 環境基準の必要性も検討すべきだと思われた。

ま と め

1995年5月から1998年3月までの約3年間, 公共用水域水質測定地点の中から10地点を選び毎月1回約1ℓ採水しサルモネラの分離を行った。

- 1 各地点ともサルモネラが分離され, 最も陽性率の高かったのは, 濁川砂田橋の69%, 最も少なかったのは平等川平等橋, 日川葡萄橋の3%であり, 計142株が分離された。
- 2 前回(86年調査)に比較し, 陽性率の上昇した地点は鎌田川高室橋, 濁川砂田橋, 濁川橋, 平等川流末の

4地点, 陽性率の低下した地点は宮川昭和橋, 相模川桂川橋の2地点であった。

- 3 142株の血清型は31種に分類され, 最多血清型は, S.Tennesseeの23株, 次いでS.Nagoyaの19株であり, また, S.Enteritidisが14株分離され, 本血清型株の流行が反映されていた。
- 4 12薬剤について薬剤感受性試験を行ったところ, いずれかに耐性を示したのは46%であった。最多血清型のS.Tennessee, S.Nagoyaでは耐性率がやや低かったが, S.Infantis, S.Enteritidis, S.Typhimuriumは耐性率が特に高かった。
- 5 SM 1 剤耐性型が耐性株全体の46%と最も高く, 血清型ではS.Enteritidis, S.Tennessee, S.Nagoyaが多かった。S.Infantis, S.Typhimuriumは3剤以上の多剤耐性型を示す株が多かった。
- 6 分離されたS.Enteritidis 14株についてプラスミドとフェージ型別の検討を行ったところプラスミドはすべて60kb単独保有, このうちPTはPT 4, SM 1 剤耐性型が6株を占めここ数年の流行と一致していた。
- 7 EEMブイヨンを用いた3本法によって砂田橋, 濁川橋, 二川橋の3地点について定量を試みたが, 定量で陽性となったのは1996年5月の砂田橋1回のみで7MPN/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およびS.Enteritidisのフェージ型別を実施して下さった国立感染症研究所の寺嶋淳先生に深謝いたします。

文 献

- 1) 金子通治: 日本公衛誌, 31, 227~233 (1984)
- 2) 金子通治, 植松香星, 中村美奈子, 高野ジュリア: 山梨衛公研年報, 32, 20~25 (1988)
- 3) 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)
- 4) 金子通治: 感染症誌, 65, 1533~1540 (1991)
- 5) Kado, C. I. & Liu, S. T.: J.Bacteriol., 145, 1365~1373 (1981)
- 6) 山梨県: 公共用水域測定結果(平成7年度)
- 7) 高橋照美, 金子通治: 山梨衛公研年報 40, 17~20 (1995)
- 8) 金子通治: 山梨衛公研年報 39, 39~44 (1995)
- 9) 金子通治: 感染症誌, 70, 792~800 (1996)