

山梨県におけるサルモネラの疫学に関する研究

(第5報) 県内河川水から定性, 定量的に分離した
サルモネラの血清型と薬剤感受性

金子通治 植松香星 中村美奈子 高野ジュリア

Epidemiological Studies of *Salmonella* in Yamanashi Prefecture
V. Antimicrobial Agents Susceptibility and Serovars
of *Salmonella* Isolated from River Water

Michiharu KANEKO, Kousei UEMATSU, Minako NAKAMURA
and Julia TAKANO

サルモネラによる食中毒の発生は, 毎年全国で約80件である。腸炎ビブリオ, ブドウ球菌による食中毒事件が減少傾向なのに対し, サルモネラによる食中毒は常に一定の件数が発生している。従って, 病因物質のうち細菌総数に対するサルモネラの占める割合は, 最近4年間(1985～1988)で逆に増加傾向にあるといえる。また, サルモネラによる散発性下痢症例の報告¹⁾も多く, カンピロバクターに次いでいるとされる。しかも, 分離株の血清型は, 年々多彩化しており, 従来あまりみられなかった血清型株による食中毒, 下痢症例も多い。全国において, ヒトをはじめ動物, 食品および環境(河川水, し尿処理施設, 下水等)中からのサルモネラの分離報告が数多くなされ, 国でその全国集計が出されている²⁾。

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的資料を得る目的で, 散発性下痢症患者由来³⁾, 河川水由来⁴⁾等のサルモネラを数多く分離してきた。

今回は, すでに報告⁴⁾した3年前(1980年7月～1983年7月)の成績と, それ以後3年経過した時点での各河川におけるサルモネラの定性, 定量的分離状況, 分離株の血清型および薬剤感受性等を比較検討したので報告する。

材料および方法

1. 材料および調査期間

図に示した県内河川のうち12採水地点から毎月1回採水した河川水405試料をサルモネラ検索用の材料とした。調査期間は1986年6月から1989年3月までの約3年間で

ある。St.No15については1回, St.No42については2回それぞれ採水できなかった。

2. サルモネラの分離, 定量および同定法

試料は約1 lの河川水である。定量は, EEMブイオンを使用し, 大腸菌群の試験に利用する最確数法(MPN法)によってサルモネラのMPNを算出した。EEMブイオンによる培養は42℃で18～24時間培養し, その一部をセレナイト培地に移植する。37℃で18時間培養後にDHL(一部, MLCB培地), SSB培地に分離培養し, 出現したコロニーを常法に従い同定した。定量分の試料(33.3ml)を使用した後, 既報⁵⁾のとおり10%塩化第二鉄溶液を加え, フロックを形成させ, 2倍濃度のSBGスルファ培地



図 県内河川と採水地点

を用いて増菌培養した。培養時間は、42℃で24、48時間で、定量の時と同様に分離、同定した。

3. MICの測定

日本化学療法学会法⁵⁾に準拠し、寒天平板希釈法によって最小発育阻止濃度 (MIC) を測定し、薬剤感受性試験とした。使用培地は、市販の感受性測定用ブイヨンおよび寒天培地である。使用薬剤は、サルファ剤(SA)、ストレプトマイシン(SM)、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)である。薬剤濃度は、SM、DOXY、CP、KM、CET、CFXおよびNAについては100~0.2 μg/ml、LMOXは50~0.1 μg/ml、SAは1,600~3.1 μg/ml、ABPCは1,600~1.6 μg/mlである。MICにおいて、SAは800 μg/ml以上、その他の9薬剤はすべて50 μg/ml以上を薬剤耐性菌とした。

4. 接合伝達性Rプラスミドの検出

すでに報告⁴⁾したとおりに実施した。すなわち、*E. coli*58-161 NA^{*}を受容菌に用い、37℃、18時間の混合培養法によった。

成 績

1. 河川、採水地点別のサルモネラ陽性数

表1に、河川、採水地点別のサルモネラ陽性数を3年前に実施した成績⁴⁾と合わせて示した。総試料数は405試料で、うちサルモネラが陽性であったのは120試料、29.6%で菌の分離数は148株であった。3年前に比較し、

陽性率、分離株数ともに減少していた。採水地点別にみると、最も陽性率が高かったのは、St.No27の宮川、昭和橋での採水試料で、3年前の成績77.1%をも大きく上回り88.2%と高率であった。また、山間部の人口密度が低い地域に位置するSt.No15の日川で33試料のうち1試料(1988年10月採水)がサルモネラ陽性となり、今後の監視が必要である。一方、St.No16の平等川流末地点でのサルモネラ陽性率は、3年前の60.0%から20.6%と大きく減少していたのが目立った。2つの河川、鎌田川、濁川の流末地点の陽性率は、3年前に比較し、約10%高くなっていた。これらは人口増加による生活排水の増量や食生活の多様化などによっていると思われる。また、3年前同様に山間部の小菅川では今回もサルモネラは分離されなかった。

2. 分離されたサルモネラの血清型

分離された148株のサルモネラは、31種(不明分を除く)の血清型に分類された。表2に血清型と分離株数を3年前の成績とともに示した。最多血清型はS. Tennesseeで35株、23.6%で、次いでS. Typhimurium15株、10.1%、S. Hadar13株、8.8%、S. Litchfield 9株、6.1%、S. Oranienburg 8株、5.4%の順であった。また、今まで県内ではヒト、動物、食品および河川水等の環境から分離例のなかったS. Kiamb、S. Reading、S. Berta、S. Ugandaが初めて分離された。

O群別では、O4が11種と最も多かったが、分離株数ではS. Tennesseeが属するO7が最も多く、57株で38.5%を占めた。

3年前の成績と比較すると、3年前は全く分離されず、今回比較的多く分離された血清型は、S. Chester、S. Oranienburg、S. Hadarなどである。逆に今回分離され

表1 河川、採水地点別のサルモネラ陽性数

河川名	採水地点	St.No	1986.6~1989.3				1980.7~1983.7			
			試料数	陽性数	(%)	菌分離数	試料数	陽性数	(%)	菌分離数
黒沢川	流末	3	34	3	8.8	4	36	8	22.2	8
鎌田川	流末	22	34	15	44.1	18	36	12	33.3	14
"	高室橋	23	34	13	38.2	17	36	17	47.2	23
荒川	二川橋	20	34	9	26.5	10	36	7	19.4	10
濁川	砂田橋	19	34	15	44.1	17	35	21	60.0	26
"	濁川橋	18	34	16	47.1	18	36	14	38.9	17
平等川	平等橋	17	34	4	11.8	5	36	3	8.3	3
"	流末	16	34	7	20.6	10	35	21	60.0	27
日川	葡萄橋	15	33	1	3.0	1	36	0		
宮川	昭和橋	27	34	30	88.2	40	35	27	77.1	36
相模川	桂川橋	30	34	7	20.6	8	35	10	28.6	12
小菅川	流末	41	32	0			29	0		
計			405	120	29.6	148	421	140	33.3	176

表2 分離されたサルモネラの血清型

O 群	血清型	分離株数 (%)	
		1986.6~1989.3	1980.7~1983.7
O4	S. Typhimurium	15(10.1)	22(11.5)
	S. Agona	7(44.7)	7(3.6)
	S. Chester	7(4.7)	0
	S. Paratyphi B	4(2.7)	15(7.8)
	S. Bredeney	4(2.7)	2(1.0)
	S. Derby	2(1.4)	9(4.7)
	S. II(sofia)	1(0.7)	9(4.7)
	S. Stanley	1(0.7)	0
	S. Schwarzengrund	1(0.7)	0
	S. Kiamb	1(0.7)	0
	S. Reading	1(0.7)	0
	O4:d:-	0	1(0.5)
	O4:-	0	1(0.5)
	O7	S. Tennessee	35(23.6)
S. Oranienburg		8(5.4)	0
S. Infantis		6(4.1)	16(8.3)
S. Thompson		3(2.0)	1(0.5)
S. Bareilly		3(2.0)	1(0.5)
S. Isangi		1(0.7)	2(1.0)
S. Ohio		1(0.7)	0
S. Braenderup		0	4(2.1)
O8		S. Hadar	13(8.8)
	S. Litchfield	9(6.1)	14(7.3)
	S. Newport	5(3.4)	1(0.5)
	S. Nagoya	3(2.0)	3(1.6)
	S. Muenchen	1(0.7)	1(0.5)
	S. Manhattan	0	4(2.1)
O9	S. Enteritidis	2(1.4)	3(1.6)
	S. Panama	1(0.7)	15(7.8)
	S. Berta	1(0.7)	0
	S. Javiana	0	2(1.0)
O3, 10	S. Anatum	1(0.7)	3(1.6)
	S. Uganda	1(0.7)	0
	S. Give	0	2(1.0)
	S. London	0	1(0.5)
	S. Vejle	0	1(0.5)
O1, 3, 19	S. Senftenberg	2(1.4)	1(0.5)
	S. Krefeld	0	4(2.1)
O13	S. Havana	4(2.7)	4(2.1)
	S. Ajijoba	0	1(0.5)
	O13:z:6	0	1(0.5)
O18	S. Cerro	2(1.4)	9(4.7)
O35	S. Adelaide	0	2(1.0)
O?	-:k:1,5	2(1.4)	0
計		148	192

なかった血清型株は、S. Braenderup, S. Manhattan, S. Javiana, S. GiveおよびS. Adelaideなどがあり、流行血清型とともに血清型の多彩化傾向が認められた。

河川、採水地点によって分離される血清型に特徴があるかを検討したのが表3である。S. Tennesseeは計35株分離されたが、相模川水系St. No27の宮川、昭和橋から29株、St. No30の相模川、桂川橋から6株と両地点ですべてを占め、他の河川、採水地点からは全く分離されなかった。また、分離株数は少ないが、S. BredeneyもSt. No22の鎌田川流末でのみ分離された。S. Hadarは濁川のSt. No19砂田橋、S. OranienburgとS. Litchfieldは鎌田川のSt. No23高室橋から比較的多く分離されており、特定の河川、採水地点から分離されるサルモネラの血清型に特徴があることがわかった。

3. 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ブイヨンを使用して3本法によって各試料のサルモネラの定量を試みた。3年前の成績を考慮し、St. No15と41は除いた。定量的にサルモネラが分離された採水地点は6ヶ所であり、表4にその採水地点と回数を示した。

St. No27宮川、昭和橋からの34試料のうち21試料が定量的にサルモネラが分離され、MPN最高値は75と高く、同地点附近は常時サルモネラが存在していることと推定される。他の採水地点では、St. No23鎌田川、高室橋のMPN 9.1が最高であった。

同一試料から定性的に分離されず、定量試験でのみ分離された例が計11回もあった。これは、サンプリングの偶然性もあろうが、やはり定性と定量試験に使用する培地の違いによると思われる、今後検討しなければならない。

表4 定量的に分離された採水地点

採水地点	試料数	分離回数	%
St. No27	34	21	61.8
20	34	4	11.8
23	34	3	8.8
30	34	2	5.9
16	34	1	2.9
17	34	1	2.9

4. 各種薬剤におけるMIC分布と耐性菌の割合

分離された148株のMICの分布を表5に示した。DOXY, CP, KM, CETおよびNAに対してはMICのピークが3.1 μg/mlであった。セフェム系第2世代のCFXはMIC3.1 μg/mlに55株、37.2%を占めたが、MICのピークは1段階低い1.6 μg/mlで84株、56.8%であり1.6~3.1

表3 採水地点別にみたサルモネラの血清型

O 群	血清型	採水地点 (St.No.)										計	
		3	22	23	16	17	18	19	20	27	30		15
O4	S. Typhimurium				1	1	2	1	3	6		1	15
	S. Agona	1		1		1			2		2	7	
	S. Chester	1	1		2			3				7	
	S. Bredeney		4									4	
	S. Paratyphi B			1			2	1				4	
	S. Derby						1		1			2	
	S. Kiamb	1										1	
	S. Schwarzengrund							1				1	
	S. Stanley		1									1	
	S. II(sofia)		1									1	
	S. Reading									1		1	
O7	S. Tennessee								29	6		35	
	S. Oranienburg		2	4			1		1			8	
	S. Infantis		2	1	1		1			1		6	
	S. Thompson				1			2				3	
	S. Bareilly		1	2								3	
	S. Ohio						1					1	
	S. Isangi								1			1	
O8	S. Hadar		1	1		1	2	6		2		13	
	S. Litchfield	1	1	4	1		1	1				9	
	S. Newport				2		2	1				5	
	S. Nagoya		2						1			3	
	S. Meunchen					1						1	
O9	S. Enteritidis					1			1			2	
	S. Panama			1								1	
	S. Berta						1					1	
O3,10	S. Anatum				1							1	
	S. Uganda								1			1	
O1,3,19	S. Senftenberg					2					2		
O13	S. Havana		1	1	1		1					4	
O18	S. Cerro			1				1				2	
O?			1				1					2	
	計	4	18	17	10	5	18	17	10	40	8	1	148

μg/mlに93.9%の株が集中し、耐性株はなかった。第1世代のCETは、3株、2.0%とわずかではあるが耐性株が存在した。オキサセフェム系のLMOXに対しては、148株すべてがMIC 0.4 μg/mlであり、とくに0.1 μg/mlは132株、89.2%と試験管内試験ではLMOXは低濃度で有効であった。

SMは今までの成績^{3,4)}同様、MICのピークは12.5 μg/mlにあり70株、47.3%を占めた。DOXYは0.8~100 μg/mlにわたってMIC値の分布がみられた。

耐性菌の占める割合は、148株のうち73株で、49.3%であり、3年前の成績31.3%より高い結果となった。薬剤ごとでは、耐性率の高い順にSA55株、37.2%、SM36

株、24.3%、DOXY28株、19.1%、KM22株、14.9%、CP12株、8.1%、CET3株、2.0%およびNA1株、0.7%の順である。3年前の成績と比較すると、KMは3.6%から14.9%に、ABPCは6.8%から12.8%に上昇し、耐性率に大きな差がみられた。これは、以前分離されなかったS. Hadarの出現が大きく関与している。

5. 耐性型と血清型およびRプラスミド保有状況

73株の耐性株は21の耐性型に分けられ、1~6剤耐性型を示した。SA1剤耐性の24株を除けば、3剤耐性株が17株と最も多く、次いで2剤耐性株の15株であった。最も多かった型はSA・SM・DOXYで7株、次いでSA・

表5 各種薬剤におけるサルモネラ148株のMIC分布

薬 剤	MIC (μ g / ml)													
	>1600	1600	800	400	200	>100	100	50	25	12.5	6.3	3.1	1.6	0.8
SA (%)	27 (18.2)	2 (1.4)	26 (17.6)	69 (46.6)	23 (15.5)	—	1 (0.7)							—
SM (%)						14 (9.5)	13 (8.8)	9 (6.1)	35 (23.6)	70 (47.3)	6 (4.1)	1 (0.7)		
DOXY (%)						16 (10.8)	8 (5.4)	4 (2.7)	12 (8.1)	5 (3.4)	27 (18.2)	55 (37.2)	16 (10.8)	5 (3.4)
CP (%)						10 (6.8)	2 (1.4)		4 (2.7)	1 (0.7)	46 (31.1)	70 (47.3)	15 (10.1)	
KM (%)						22 (14.9)				1 (0.7)	27 (18.2)	98 (66.2)		
ABPC (%)		8 (5.4)	5 (3.4)	4 (2.7)	2 (1.4)	—				6 (4.1)		14 (9.5)	109 (73.6)	—
CET (%)						3 (2.0)			1 (0.7)	4 (2.7)	8 (5.4)	90 (60.8)	41 (27.7)	1 (0.7)
CFX (%)									4 (2.7)	1 (0.7)	3 (2.0)	55 (37.2)	84 (56.8)	1 (0.7)
NA (%)						1 (0.7)				5 (3.4)	25 (16.9)	115 (77.7)	2 (1.4)	

LMOX: $\geq 0.8:0$, $0.4:6(4.1)$, $0.2:10(6.8)$, $\leq 0.1:132(89.2)$

表6 主な耐性型と血清型

耐 性 型	株 数	血 清 型
SA・SM・DOXY・CP・KM・ABPC	5	S. Typhimurium(3), S. Ohio, S. Infantis
SA・SM・DOXY・CP	4	S. Typhimurium, S. Thompson(2), S. Havana
SA・SM・DOXY	7	S. Litchfield(4), S. Paratyphi B, S. Newport, S. II(sofia)
SM KM・ABPC	4	S. Hadar(4)
SM・DOXY KM	3	S. Hadar(3)
SM KM	5	S. Hadar(5)
SA・SM	3	S. Chester, S. Kiamb, S. Infantis
SA DOXY	3	S. Litchfield(3)

SM・DOXY・CP・KM・ABPC 5株, SM・KM 5株である。SA・SM・DOXY型の7株のうち4株がS. Litchfield, SA・SM・DOXY・CP・KM・ABPC型の5株のうち3株がS. Typhimurium, SM・KM型5株はいずれもS. Hadarであり, 耐性型とその血清型に特徴がみられた。表6に3株以上同じ耐性型をもつ血清型を示し, また, 分離株数が比較的多く, しかも耐性が多い血清型を表7に示した。S. Typhimuriumは依然として耐性株が多く, 多剤耐性株が目立つ。S. Litchfieldも同様な傾向にある。しかし, S. Hadarは以前は分離されなかったものの, 今回分離

表7 耐性率の高い血清型

O 群	血 清 型	分離株数	耐性株数	耐性率(%)
O4	S. Typhimurium	15	9	60
	S. Chester	7	5	71.4
	S. Agona	7	1	14.3
O7	S. Tennessee	35	13	37.1
	S. Oranienburg	8	0	
O8	S. Hadar	13	13	100
	S. Litchfield	9	9	100

された13株はいずれも耐性株で、うち12株はSMとKM
に対して耐性であるという特徴があった。

接合伝達性Rプラスミドは、73株のうち42株、57.5%
と3年前の成績より低率であった。これは、SA1耐耐
性が28株と多かったためであると考えられる。

考 察

3年前の河川水からのサルモネラ分離の試み⁴⁾に引き
続き、今回、12の採水地点を選び、その後のサルモネラ
分離状況はどのようであるかを比較検討した。

河川別のサルモネラ陽性率は、3年前の33.3%から
29.6%と減少していた。しかし、3年前より陽性率が高
くなった採水地点は6地点で、低くなった5地点を上回っ
た。St.No.27は、富士吉田市の都市排水が主であるとい
え、88.2%の高率でサルモネラが分離され、サルモネ
ラが常在しているとさえ思われる。しかも、血清型は3
年前と同様S.Tennesseeが圧倒的に多く、その原因を検
討しているところである。また逆にSt.No.16では3年前
の60.0%から20.6%と低下した。これは、1つにはす
でに指摘⁵⁾したと畜場からの排水方法等の改善がなされた
結果であるとも考えられる。

分離株148株は31種類の血清型に分類されたが、3年
前と数のうえでは変わらなかった。しかし、3年前は分
離されず今回分離された血清型は10種で、またその逆も
10種であった。今回分離された血清型のうち、S.Hadar,
S.Chester, S.Oranienburgは、近年散发性下痢症患者
等からもその分離例⁶⁾が目立ち、最近の流行型である
と思われる。S.Kiamb, S.Reading, S.Uganda等の血清
型は、県内ではヒトからの分離例はない。全国の情報²⁾
によってもヒト由来株は少なく、血清型の多彩化がすす
んでいた。

特定の河川、採水地点から分離されるサルモネラの血
清型にわずかではあるが特徴がみられた。宮川のSt.No.

27のS.Tennessee、鎌田川のSt.No.22のS.Bredeney等で、
これらは周辺地域からの諸要因によるサルモネラの排出
も考えられ、今後の検討課題である。

採水地点から定量的にサルモネラが分離された。これ
らの採水地点はSt.No.30の桂川橋を除いては、県内では
“きたない河川”と評価⁷⁾されている。河川水からのサル
モネラ分離率は、県内河川の水質評価のランク⁷⁾とはば
一致し、河川水からのサルモネラ検索によって逆に水質
評価のランク付けもできるであろう。

MIC測定の結果は、3年前とはほぼ同じであったが、
KM, ABPCに対する耐性率は上昇していた。この原因
は、分離率の比較的高かったS.HadarがKM, ABPC耐
性であったためであると考えられる。

河川水からのサルモネラ分離は、散发性下痢症患者、
食中毒患者等から分離されるサルモネラ同様、最近の流
行血清型等が把握でき、疫学上重要であると考ええる。

稿を終るにあたり、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は深謝いたし
ます。

文 献

- 1) 深見トシエラ：感染症誌，58，297～303（1984）
- 2) 厚生省保健医療局結核・感染症対策室：感染症サー
ベイランス事業年報，昭和62年，195～198（1988）
- 3) 金子通治，中村美奈子，植松香星：第62回日本感染
症学会総会学術講演抄録，感染症誌，62，臨時増刊
号155（1988）
- 4) 金子通治：日本公衛誌，31，227～233（1984）
- 5) 日本化学療法学会：Chemotherapy，29，76～79
（1981）
- 6) 金子通治：日本公衛誌，32，602～608（1985）
- 7) 清水源治，高橋照美，堤 充紀：山梨衛公研年報，
31，44～48（1987）