

サルモネラ菌に関する調査研究

(第1報) 山梨県で分離されたサルモネラ菌の菌型, 薬剤感受性および R プラスミッド保有状況

金子 通治

サルモネラ菌による食中毒, 下痢症および環境汚染が多数報告され¹⁻⁶⁾, その食品汚染状況や食品汚染経路の汚染防止ならびに原因究明, サルモネラ感染症の感染源究明に公衆衛生, 環境衛生面から非常に大きな関心がむけられている。また, 輸入食肉および輸入飼料の増加に伴うサルモネラ菌の汚染拡大, 菌の多型化, 薬剤耐性化も報告されている⁷⁻⁹⁾。近年の海外旅行者の増加に伴う輸入腸管系感染症の多発も関係各機関の憂慮するところである。これらサルモネラ食中毒やサルモネラ症の増加に伴ない市販食肉, 食肉処理場, 尿, 下水, 河川水等の環境汚染調査も行なわれ, 汚染防止, 感染経路, 感染源究明に強い関心がもたれている。

山梨県においては, 昭和45, 46年と50, 51年に市販食肉のサルモネラ菌汚染調査が実施された¹⁰⁾。しかし, 公衆衛生, 環境衛生, 臨床面からのサルモネラ汚染の実態は不明であった。今回, サルモネラ菌に関する調査研究の第1報として, 昭和44年から54年までに山梨県で分離されたサルモネラ菌についてその菌型, 薬剤感受性およびRプラスミッド保有状況を検討したので報告する。

材料および方法

1. 供試菌株

山梨県で分離された計207株である。うち107株はヒト由来で県内医療機関, 検査機関で分離され同定を依頼してきた株ならびに食中毒事件の患者から分離された株である。88株は食品由来で取去食品および県内検査機関で分離され同定を依頼してきた株ならびに食中毒事件で分離された株である。12株はその他の由来で下水およびプロイラーの直腸から分離された株である。

2. 検査方法

食品が検査材料の場合は主としてEEMパイオンで前培養しセレナイト培地に移植後, SSB培地で分離した。便が検査材料の場合にはセレナイト培地で増菌後, SSB培地で分離を行なった。サルモネラ菌の確認は通常の方法により行ない同定した。

3. 薬剤感受性試験

サルモネラ菌の薬剤感受性試験は, ストレプトマイシン(SM), クロルテトラサイクリン(TC), クロラムフェニコール(CP), アミノベンジルペニシリン(AB-PC), カナマイシン(KM)およびサルファ剤(SA)の6薬剤について寒天希釈法によって最小発育阻止濃度(MIC)を測定した。寒天培地は薬剤感受性ディスク用培地を使用した。薬剤濃度はSM, TC, CP, KMについては6.25~200 μ g/ml, AB-PCは25~3,200 μ g/ml, SAは25~800 μ g/mlである。

4. 伝達性Rプラスミッドの検出

MICにおいて, SM, TC, CP, KM, AB-PCは50 μ g/ml以上を, SAは200 μ g/ml以上を薬剤耐性菌と判定した。Rプラスミッドの検出は, 受容菌にナリジキシン酸(NA)耐性を付与した*E. coli* 58—161を用い37°C, 18hrの混合培養法で実施した。

成 績

1. 分離されたサルモネラ菌の菌型

分離されたサルモネラ菌は計207株である。そのうち菌型が決まったものは196株であり, 29種におよんだ。表1に菌型と由来別の株数を示した。由来別にみるとヒト由来107株(51.7%), 食品由来88株(42.5%)でその他由来は12株(5.8%)であった。群別ではB群が最も多く124株(59.9%)で次いでD₁群37株(17.9%), C₁群19株(9.2%), C₂群18株(8.7%), E₁群6株(2.9%), E₄群2株(1.0%), G群1株(0.5%)の順で分離された。菌型別にみると*S. typhimurium*が88株で42.5%をも占め最も多く, ヒトから47株(ヒト由来中43.9%), 食品から38株(食品由来中43.2%)とヒト, 食品由来別の差がなく, 多く分離され*S. typhimurium*が流行菌型であることがわかる。次いで*S. enteritidis*が23株(11.1%)であった。しかし, 最近では*S. thompson*, *S. infantis*, *S. litchfield*が比較的よく分離されている。

表1 サルモネラ菌の菌型と分離株数

群別	菌型	由来			合計(%)	
		ヒト	食品	その他		
B	<i>S. typhimurium</i>	47	38	3	88(42.5)	
	<i>S. bredeney</i>	0	8	0	8 (3.9)	
	<i>S. derby</i>	0	5	0	5 (2.4)	
	<i>S. sofia</i>	0	4	0	4 (1.9)	
	<i>S. heidelberg</i>	1	2	0	3 (1.4)	
	<i>S. agona</i>	1	2	0	3 (1.4)	
	<i>S. paratyphi B</i>	1	0	2	3 (1.4)	
	<i>S. schwarzengrund</i>	0	1	0	1 (0.5)	
	<i>S. java</i>	1	0	0	1 (0.5)	
B : 同定中		4	1	3	8 (3.9)	
C ₁	<i>S. thompson</i>	2	5	0	7 (3.4)	
	<i>S. infantis</i>	3	3	0	6 (2.9)	
	<i>S. choleraesuis</i>	1	0	0	1 (0.5)	
	<i>S. braenderup</i>	1	0	0	1 (0.5)	
	<i>S. ohio</i>	1	0	0	1 (0.5)	
	<i>S. montevideo</i>	0	0	1	1 (0.5)	
	C ₁ : 同定中		0	1	1	2 (1.0)
C ₂	<i>S. blockley</i>	0	5	0	5 (2.4)	
	<i>S. litchfield</i>	4	0	0	4 (1.9)	
	<i>S. nagoya</i>	2	1	0	3 (1.4)	
	<i>S. kottbus</i>	0	1	0	1 (0.5)	
	<i>S. manhattan</i>	1	0	1	2 (1.0)	
	<i>S. kentucky ?</i>	0	3	0	3 (1.4)	
D ₁	<i>S. enteritidis</i>	19	4	0	23(11.1)	
	<i>S. typhi</i>	12	0	0	12 (5.8)	
	<i>S. javiana</i>	1	0	0	1 (0.5)	
	<i>S. panama</i>	1	0	0	1 (0.5)	
E ₁	<i>S. anatum</i>	1	3	0	4 (1.9)	
	<i>S. meleagridis</i>	2	0	0	2 (1.0)	
E ₄	<i>S. taksony</i>	0	0	1	1 (0.5)	
	<i>S. senftenberg</i>	1	0	0	1 (0.5)	
G	G : 同定中		0	1	0	1 (0.5)
合計		107	88	12	207	

2. 薬剤感受性

分離された207株全株の薬剤感受性試験を行なった。結果は図1に示した通りである。6薬剤のMICを横軸にとり、縦軸には207株に対するMIC値の占める割合を%で表わした。図中の数値は株数の実数である。例えばAB-PCについてみると、MICが25 μ g/ml以下が207株中202株で97.6%を占め、400 μ g/mlが1株で0.5%、800 μ g/mlが4株で1.9%であった。CP, KMに対する感受性の分布をみると、MICが6.25 μ g/ml以下がそれぞれ99.0, 92.3%を占めMICが高い場合は200 μ g/ml以上で、中間値は全くみられず、AB-PCも同様な傾向であった。TCについてみると、6.25 μ g/ml以下が約80%を占め、50~200 μ g/mlが42株で約20%と、CP, KMと比較するとMICが高い株の割合が多くみられた。SMに対するMICは6.25 μ g/ml \geq 200 μ g/mlのすべてに分布された。MICが低い部分ではTCと異なるが、100 μ g/ml以上の高い部分ではTCと同様であった。SAはMICが概して高く、400~800 μ g/mlが174株と84.1%にも達した。

MIC値においてSM, TC, CP, KM, AB-PCは50 μ g/ml, SAは200 μ g/ml以上の菌をそれぞれの薬剤に耐性であると判定し、由来別の薬剤耐性パターンを表2に示した。SA1剤, SA \cdot SM, SA \cdot TC, SA \cdot SM \cdot TCの耐性パターンを示す株はヒト, 食品の由来別にかかわらず差はなかった。また、上記四つのパターンを示す株は全菌株207株中181株を占め、87.4%にも達していた。それに反し、(TC1剤耐性菌を除いては)KM, CP, AB-PCの薬剤いずれかに耐性のものなかでSA \cdot SM \cdot TC \cdot KMの耐性パターンの1株とSA \cdot SM \cdot TC \cdot AB-PCの1株を除いてはすべてヒト由来株であった。このことから多剤耐性菌またはCP, KM, AB-PC耐性菌はヒト由来株から分離される頻度が高いことが示唆された。

菌型でみると、TC1剤耐性は2株とも*S. derby*, SA \cdot SM \cdot TC \cdot AB-PC耐性は2株とも*S. manhattan*, SA \cdot TC \cdot CP耐性は*S. enteritidis*, SA \cdot KM耐性は*S. anatum*, SA \cdot SM \cdot AB-PC耐性は*S. heidelberg*で、SA \cdot SM \cdot TC \cdot KMの6株, SA \cdot TC \cdot KM, SM \cdot TC \cdot KM, SA \cdot SM \cdot TC \cdot KM \cdot AB-PC, SA \cdot SM \cdot TC \cdot CP \cdot KM \cdot AB-PC耐性株はすべて*S. typhimurium*であった。全菌株207株中最も多く分離された*S. typhimurium*(88株, 42.5%)は、現在最も分離頻度が高く、薬剤に対する耐性菌も増えてきていると言われている。表3に*S. typhimurium*についての耐性のパターンを示した。SA \cdot SM耐性16株, SA \cdot TC耐性11株, SA \cdot SM

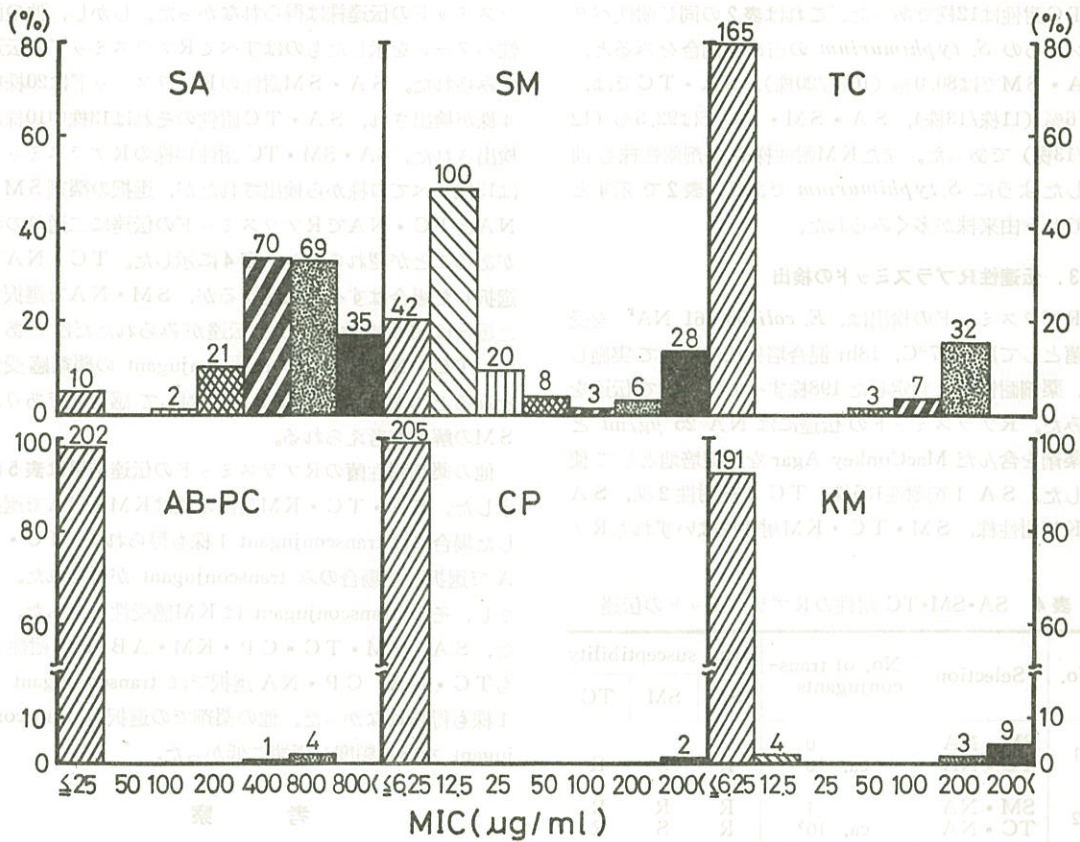


図1 分離株の薬剤感受性分布

表2 由来別の薬剤耐性パターン

耐性パターン	由来			株数合計 (%)
	ヒト	食品	その他	
SA	71	55	9	135(65.2)
SA・SM	8	12	0	20(9.7)
SA・TC	5	8	0	13(6.3)
SA・SM・TC	5	8	0	13(6.3)
SA・SM・TC・KM	5	1	0	6(2.9)
TC	0	2	0	2(1.0)
SA・SM・TC・AB-PC	1	0	1	2(1.0)
SA・KM	1	0	0	1(0.5)
SA・TC・CP	1	0	0	1(0.5)
SA・TC・KM	1	0	0	1(0.5)
SA・SM・AB-PC	1	0	0	1(0.5)
SM・TC・KM	1	0	0	1(0.5)
SA・SM・TC・KM・AB-PC	1	0	0	1(0.5)
SA・SM・TC・CP・KM・AB-PC	1	0	0	1(0.5)
Sensitive	5	2	2	9(4.3)
合計	107	88	12	207

表3 *S. typhimurium* の耐性パターン

耐性パターン	由来			株数合計
	ヒト	食品	その他	
SA	25	10	2	37
SA・SM	5	11	0	16
SA・SM・TC	4	8	0	12
SA・TC	3	8	0	11
SA・SM・TC・KM	5	1	0	6
SA・TC・KM	1	0	0	1
SM・TC・KM	1	0	0	1
SA・SM・TC・KM・AB-PC	1	0	0	1
SA・SM・TC・CP・KM・AB-PC	1	0	0	1
Sensitive	1	0	1	2
合計	47	38	3	88

・TC耐性は12株であった。これは表2の同じ耐性パターンからの *S. typhimurium* の占める割合をみると、SA・SMでは80.0% (16株/20株)、SA・TCでは、84.6% (11株/13株)、SA・SM・TCでは92.3% (12株/13株)であった。またKM耐性株や多剤耐性株も前述したように *S. typhimurium* であり、表2で示すとおりヒト由来株が多くみられた。

3. 伝達性Rプラスミッドの検出

Rプラスミッドの検出は、*E. coli* 58-161 NA^r を受容菌として用い37°C、18hr 混合培養法によって実施した。薬剤耐性菌と判定した198株すべてについて伝達を試みた。Rプラスミッドの伝達にはNA 25 µg/mlと各薬剤を含んだMacConkey Agarを選択培地として使用した。SA 1剤耐性135株、TC 1剤耐性2株、SA・KM耐性株、SM・TC・KM耐性株はいずれもR

ラスミッドの伝達株は得られなかった。しかし、他の耐性パターンを示したものはすべてRプラスミッドの伝達のみみられた。SA・SM耐性のRプラスミッドは20株中4株が検出され、SA・TC耐性のそれは13株中10株が検出された。SA・SM・TC耐性13株のRプラスミッドは13株すべての株から検出されたが、選択の薬剤SM・NAとTC・NAでRプラスミッドの伝達に二通りの型があることが認められた。表4に示した。TC・NAで選択した場合はすべて伝達するが、SM・NAで選択した場合は6株においてのみ伝達のみみられただけであった。TC・NA選択でのtransconjugantの薬剤感受性をみると3株を除いてはSMに対して感受性であり、SMの解離が考えられる。

他の薬剤耐性菌のRプラスミッドの伝達結果は表5に示した。SA・TC・KM耐性の株はKM・NAで選択した場合にはtransconjugant 1株も得られず、TC・NAで選択した場合のみtransconjugant が得られた。しかし、そのtransconjugant はKM感受性であった。また、SA・SM・TC・CP・KM・AB-PC耐性株もTC・NA、CP・NA選択ではtransconjugant が1株も得られなかった。他の薬剤での選択もtransconjugant を得る頻度が極端に低かった。

表4 SA・SM・TC耐性のRプラスミッドの伝達

No.	Selection	No. of trans-conjugants	Drug susceptibility		
			SA	SM	TC
1	SM・NA TC・NA	0 ca. 10 ⁵	R	S	R
2	SM・NA TC・NA	1 ca. 10 ⁵	R R	R S	R R
3	SM・NA TC・NA	0 ca. 10 ⁵	R	S	R
4	SM・NA TC・NA	0 ca. 10 ⁵	R	S	R
5	SM・NA TC・NA	0 ca. 10 ⁵	R	S	R
6	SM・NA TC・NA	0 ca. 10 ⁵	R	S	R
7	SM・NA TC・NA	0 ca. 10 ⁵	R	S	R
8	SM・NA TC・NA	1 ca. 10 ⁵	R R	R S	S R
9	SM・NA TC・NA	0 ca. 10 ⁵	R	S	R
10	SM・NA TC・NA	2 10 ³	R R	R S	R R
11	SM・NA TC・NA	126 1	R R	R R	S R
12	SM・NA TC・NA	3 2	R R	R R	R R
13	SM・NA TC・NA	ca. 10 ⁵ ca. 10 ⁵	R R	R R	R R

* SM 25 µg/ml
TC 25 µg/ml
NA 25 µg/ml

R : Resistance
S : Sensitive

考 察

サルモネラ菌に関する調査研究の第1報として今までに得られた207の菌株について菌型、薬剤感受性およびRプラスミッドの検出を試みた。菌型は29種であり、*S. typhimurium* が全菌株の42.5%をも占め、ヒト、食品の由来別にかかわらず分離され流行菌型であった。法定伝染病で腸チフスの原因菌である *S. typhi* は12株すべてがヒトから分離され、7株がSA 1剤耐性、1株がSA・SM耐性 (Rプラスミッド検出) で他の4株は薬剤感受性であった。また、パラチフスの原因菌である *S. paratyphi B* も3株分離されたが、ヒト由来は1株のみで他の2株は下水由来であった。法定伝染病の原因菌だけに防疫上留意するとともに、環境汚染面での調査を充分行う必要があろう。*S. manhattan* は2株分離された。1株はプロイラーの直腸から、もう1株はヒトから分離されたのである。そして両株ともにSA・SM・TC・AB-PC耐性をもっており、Rプラスミッドが検出されたことは、食品衛生上からも管理面に十分な注意を必要とする。*S. panama* (SA・SM・TC耐性：Rプラスミッド検出) がヒトより分離されたが、これは臨床的に赤痢が疑われた患者から分離された株で、海外旅行者からの分離報告例もあり¹¹⁾、*S. typhi* と同様にサルモネラ感染症として注意を要する菌であろう。今後動物種別、ヒト由来、さらには生活環境から下水由来の

表5 各薬剤耐性パターンのRプラスミッドの伝達

Resistance pattern	Selection	No. of trans-conjugants	Drug susceptibility						
			SA	SM	TC	CP	KM	AB-PC	
SA•TC•CP (1株)	TC•NA	10 ⁴	R	—	R	R	—	—	
	CP•NA	10 ⁴	R	—	R	R	—	—	
SA•TC•KM (1株)	TC•NA	10 ⁴	R	—	R	—	S	—	
	KM•NA	0							
SA•SM•AB-PC (1株)	SM•NA	ca. 10 ⁵	R	R	—	—	—	R	
	AB-PC•NA	ca. 10 ⁵	R	R	—	—	—	R	
SA•SM•TC•AB-PC (2株)	SM•NA	ca. 10 ⁵	R	R	R	—	—	R	
	TC•NA	ca. 10 ⁵	R	R	R	—	—	R	
	AB-PC•NA	ca. 10 ⁵	R	R	R	—	—	R	
SA•SM•TC•KM•AB-PC (1株)	SM•NA	10 ⁴	R	R	R	—	R	R	
	TC•NA	10 ⁴	R	R	R	—	R	R	
	KM•NA	10 ⁴	R	R	R	—	R	R	
	AB-PC•NA	10 ⁴	R	R	R	—	R	R	
SA•SM•TC•CP•KM•AB-PC (1株)	SM•NA	15	R	R	S	S	R	R	
	TC•NA	0							
	CP•NA	0							
	KM•NA	19	R	R	S	S	R	R	
	AB-PC•NA	22	R	R	S	S	R	R	
SA•SM•TC•KM (6株)	3株	SM•NA	ca. 10 ⁵	R	R	R	—	R	—
		TC•NA	ca. 10 ⁵	R	R	R	—	R	—
		KM•NA	ca. 10 ⁵	R	R	R	—	R	—
SA•SM•TC•KM (6株)	1株	SM•NA	ca. 10 ⁵	R	R	S	—	S	—
		TC•NA	0						
		KM•NA	0						

*SM, TC, CP, KM : 25 µg/ml
 AB-PC : 200 µg/ml
 NA : 25 µg/ml

R : Resistance
 S : Sensitive

サルモネラ菌検索を実施し、サルモネラ感染症や食中毒予防の面で検討したいと考える。

薬剤感受性試験とRプラスミッドの検出を実施したが2薬剤以上に耐性の株は61株、29.5%あり、そのうちRプラスミッドが検出されたのは38株(62.3%)であった。38株を由来別にみるとヒト由来20株(52.6%)、食品由来17株(44.7%)、その他(プロイラー直腸)由来1株(2.6%)からRプラスミッドが検出された。動物由来サルモネラ菌のRプラスミッドの伝達は、37°Cよりも25°Cで有効に伝達するという報告もあり¹²⁾、今回検出された株を含め伝達時の培養温度、培養時間の検討は必要であろう。また、SMのMIC 25 µg/mlのサルモネラ菌20株については、伝達時の選択濃度を12.5 µg/mlにしてRプラスミッドが検出できるかどうか検討しなければならない。得られたRプラスミッドの中で温度感受性があるかどうか、大腸菌への再伝達の際の態度はどうか、耐性マーカーの解離はあるかなど、さらに検討してみたい。

文 献

- 1) 岸本敬之ら：食品衛生研究 29, 29~35 (1979)
- 2) 善養寺 浩：感染症誌 52, 95~97 (1978)
- 3) 芦田博之, 宮崎瑤子, 岡田正次郎：埼玉衛研所報 6, 97~107 (1973)
- 4) 内田耕博, 伊吹彦三：京都府衛研年報 16, 23~28 (1971)
- 5) 菊井立子, 下妻悦子：岡山衛研年報 20, 29~34 (1973)
- 6) 森田盛大ら：秋田衛研所報 20, 37~39 (1976)
- 7) 藤田 雅：家畜衛誌報告 75, 9~15 (1977)
- 8) 鈴木 昭ら：食衛誌 15, 159~176 (1974)
- 9) 河西 勉, 鈴木 昭, 小沼博隆：衛生試報 95, 99~107 (1977)
- 10) 金子通治ら：第6回山梨県公衆衛生研究発表会講演要旨, 21~22 (1971)
- 11) 久万順子ら：愛媛衛研年報 40, 1~5 (1979)
- 12) 寺門誠致ら：第40回日本細菌学会関東支部総会講演抄録, 35 (1978)