

1986年から1991年に千葉県で分離された*Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Enteritidisのプラスミドプロファイル、薬剤感受性およびファージ型について

平塚奈美子¹⁾, 岸田 一則²⁾, 小岩井健司²⁾, 鶴岡 佳久²⁾

Plasmid profile, Antibiotic Susceptibility and
Phage Type of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar
Enteritidis Isolated in Chiba prefecture. (1986~1991)

Namiko HIRATSUKA, Kazunori KISHIDA,
Kenji KOIWAI and Yoshihisa TSURUOKA

Summary

We examined *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Enteritidis strains isolated from patients and carriers with 11 outbreaks and 70 sporadic cases for plasmid profile, antibiotic susceptibility and phage type during the period from 1986 to 1992 in Chiba Prefecture.

Strains carried only 60 kbp plasmid were found in 10 outbreaks (91%) and 51 (72%) sporadic cases.

Phage type determination were performed for the strains isolated 10 outbreaks. The strains were belonging to phage type 4 (7 cases), phage type 34 (2 cases) and phage type 1 (one case).

In the period from 1989 to 1992, streptomycin single resistant strains were isolated from 8 outbreaks (73%) and 43 sporadic cases (61%), which were not isolated before.

I. はじめに

欧米諸国では1980年代後半から、鶏卵あるいは卵製品を原因とする*Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Enteritidis (以下 *S. Enteritidis*) による食中毒が多発し、食品衛生面で注目されている¹⁾。わが国でも1989年以降、欧米と同様に*S. Enteritidis*による食中毒が多数報告され、また、散発下痢症患者あるいは健康保菌者も急増し、食品衛生および公衆衛生上大きな問題となっている^{2,3)}。

千葉県においても、1989年から食中毒や散発下痢症患者からの*S. Enteritidis*の分離例が急激に増加した。

ところで、菌株の遺伝学的特徴をみるのにプラスミドプロファイルによる型別がある。この方法は、薬剤感受性、ファージ型などと組み合わせることにより、感染源

の追求等の疫学的調査に有用な方法となりうる⁴⁾。

そこで、千葉県内で分離された*S. Enteritidis*の疫学的動向を調べるため、本菌による食中毒が全国的に急増した1989年の前後における、本菌のプラスミドプロファイル、薬剤感受性およびファージ型を調査し、流行以前に分離された*S. Enteritidis*と流行後の*S. Enteritidis*の遺伝学的特徴を比較検討した。

II. 材料および方法

1. 供試菌株

1986年から1991年の6年間に、県内で分離された散発下痢症患者および健康保菌者から分離された70株と11事例の食中毒由来35株を用いた。また、1992年7月に発生した2事例の食中毒から分離された15株も併せて供試した。

2. プラスミドの分離

プラスミドの抽出は、KadoおよびLiuの方法⁵⁾に準じた。抽出したプラスミドDNAは0.7%アガロースゲル

1) 杏林大学保健学部

2) 千葉県衛生研究所

(1992年12月20日受理)

表1 千葉県におけるヒト由来サルモネラの検出状況 (1982年~1991年)

順位	年	1982	1983	1984	1985	1986
1	S. Typhimurium	47(23.3)	S. Typhimurium 62(34.4)	S. Typhimurium 22(16.5)	S. Typhimurium 35(21.5)	S. Typhimurium 17(10.2)
2	S. Newport	30(14.9)	S. Java 9(5.0)	S. Infantis 17(12.8)	S. Litchfield 28(17.2)	S. Infantis 14(8.4)
3	S. Agona	14(6.9)	S. Bareilly 7(3.9)	S. Litchfield 7(5.3)	S. Thompson 9(5.5)	S. Litchfield 12(7.2)
4	S. Panama	12(5.9)	S. London 7(3.9)	S. Derby 7(5.3)	S. Typhi 8(4.9)	S. Typhi 9(5.4)
5	S. Litchfield	10(5.0)	S. Typhi 6(3.3)	S. Thompson 6(4.5)	S. ParatyphiB 8(4.9)	S. Agona 8(4.8)

順位	年	1987	1988	1989	1990	1991
1	S. Oranienburg	49(26.5)	S. Hadar 31(20.4)	S. Enteritidis 72(31.6)	S. Enteritidis 31(17.0)	S. Enteritidis 103(38.3)
2	S. Hadar	18(9.7)	S. Typhimurium 19(12.5)	S. Hadar 21(9.2)	S. Typhimurium 20(11.0)	S. Montevideo 22(8.2)
3	S. Typhimurium	12(6.5)	S. Litchfield 10(6.6)	S. Typhimurium 16(7.0)	S. Thompson 17(9.3)	S. Braenderup 14(7.7)
4	S. Typhi	11(5.9)	S. Infantis 7(4.6)	S. Litchfield 13(5.7)	S. Hadar 8(4.4)	S. Potsdam 14(7.7)
5	S. Anatum	10(5.4)	S. Heidelberg 5(3.3)	S. Infantis 12(5.3)	S. Newport 8(4.4)	S. Typhimurium 12(6.6)

() : 各年におけるヒト由来サルモネラに占めるパーセント。

※食中毒は1事例1株として計上した。

1986年から1991年に千葉県で分離された*Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Enteritidis のプラスミドプロファイル、薬剤感受性およびファージ型について

で50V, 75分電気泳動後、ゲルをエチジウムブロマイドで染色し、紫外線照射下で撮影した。

プラスミドサイズの大きさは、東京医科歯科大学堀内三吉博士より分与を受けた*S. Enteritidis* L156 (200, 60, 1.4kbp), *Escherichia coli* NRI (90kbp) および *Escherichia coli* V517 (7.4, 5.7, 5.2, 4.0, 3.1, 2.8, 2.2, 1.4kbp) および λ / *Hind* III digestion (23.1, 9.42, 6.56, 4.36, 2.32, 2.02kbp) を対照とし、同時に電気泳動をして測定した。

3. 薬剤感受性試験

米国臨床検査標準委員会 (NCCLS) の抗菌薬ディスク感受性試験実施基準⁹⁾に基づき、センシディスク (BBL) を用いて行った。使用薬剤はアンピシリン (ABPC), セファゾリン (CZ), セファロリジン (CER), カナマイシン (KM), ゲンタマイシン (GM), 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), コリスチン (CL), ナリジクス酸 (NA), ピペミド酸 (PPA) およびスルファメトキサゾール・トリメトプリム合剤 (ST) の12剤である。

4. ファージ型別

10事例の食中毒由来49株について、国立予防衛生研究所ファージ型別室に依頼した。

III. 成績

1. *S. Enteritidis* の年次別分離状況

1982年から1991年の10年間に、千葉県内で分離されたヒト由来のサルモネラの検出状況を表1に示した。1986年までは*S. Typhimurium*が常に第1位の分離状況であったが、1987~1989年には*S. Hadar*が上位に進出し、1988年には第1位を占めた。しかし、1989年以降は*S. Enteritidis*が最も多く検出されるようになった。

表2に1982年から1991年の、本県における*S. Enteritidis*の年次別分離状況を示した。1988年までは毎年1~5株の分離状況であり、サルモネラの分離総数の1~3%程度であったが、本菌が全国的に流行した1989年以降は、サルモネラの分離総数の20~40%を占めた。また、食中毒の発生状況をみると、流行前の1982年から1988年まではわずか2事例あったが、1989年から1991年の間は7事例と増加し、表には示していないが1992年も9月現在すでに4事例と増加傾向を示している。

2. プラスミドプロファイルとファージ型

食中毒由来株のプラスミドプロファイルとファージ型を表3に示した。

表2 ヒト由来*S. Enteritidis*の年次別分離状況 (1982年~1991年)

年	<i>S. Enteritidis</i> の分離株数 (%)	サルモネラの分離総数
1982	5 (2.5)	202
1983	4 (2.2)	162
1984	1 (0.8)	128
1985	4 (2.5)	161
1986	1 [1] (0.6)	147
1987	3 [1] (2.7)	159
1988	1 (0.7)	137
1989	72 [3] (33.8)	222
1990	31 (17.0)	182
1991	88 [4] (38.2)	226

[] : *S. Enteritidis*による食中毒事例数

※ 食中毒は1事例を1株として計上した。

表3 食中毒由来*S. Enteritidis*のプラスミドプロファイルとファージ型

年	事例	プラスミドプロファイル(kbp)			ファージ型
		60	60,8.7,8.5	保有せず	
1986	A	●			4
1987	B	●			4
	(B原因食牛刺し)	●			4
1989	C	●			34
	D	●			ND
	E	●			34
1991	F	●			4
	G	●			4
	H	●		●	4
	I	●			4
	J		●		1
1992	K	●			4

※ ND : 型別未実施

供試した食中毒11事例由来50株のうちプラスミド保有株は45株で、11事例の食中毒由来株はすべて60kbpのプラスミドを保有していた。そのうち60kbpのプラスミドを単独保有する株が9事例40株(80%)と大半を占めた。H食中毒では、60kbp単独保有株とプラスミドを保有しない株が同時に検出された。また、J食中毒由来株は60kbp, 8.7kbpおよび8.5kbpのプラスミドを保有していた。H食中毒を除き、同じ食中毒から分離された株はすべて同じプラスミドプロファイルであった。

1987年に発生したB食中毒では、患者から分離された株と原因食であった牛刺し由来の株は同一のプラスミドプロファイルであった。

ファージ型についてみると、同一の食中毒から分離された株はすべて同じファージ型で、10事例中7事例がファージ型4であった。しかし、1989年の2事例のファージ型

は34であり、また、1992年のJ食中毒から分離された株はフェージ型1であった。

散発下痢症患者および健康保菌者由来株のプラスミドプロファイルを表4に示した。供試した70株のうちプラスミド保有株は65株(93%)、うち60kbpプラスミド単独保有株が51株(73%)であった。また、食中毒由来株からは検出されなかった66kbpや60kbpと55kbpのプラスミドを保有する株が検出された。

表4 散発下痢症患者および健康保菌者由来 S. Enteritidis のプラスミドプロファイル (n=70)

年	プラスミドプロファイル (kbp)				
	60	60,55	66	60,8,7,8,5	保有せず
1986	4				
1987	1				
1988	1				
1989	12	5	2		2
1990	13	5			2
1991	20	1		1	1
計(%)	51(72.8)	11(15.7)	2(2.8)	1(1.4)	5(7.1)

食中毒由来株と散発下痢症由来株は、ともに流行前の1988年以前はすべて60kbpのプラスミド単独保有株であったが、流行後は60kbp単独保有株の他に、大きさの異なるプラスミドを持つ株やプラスミドを保有しない株が検出された。

食中毒および散発下痢症由来株のプラスミドプロファイルは5種類に分類されたが、その電気泳動パターンを図1に示した。

3. 薬剤感受性

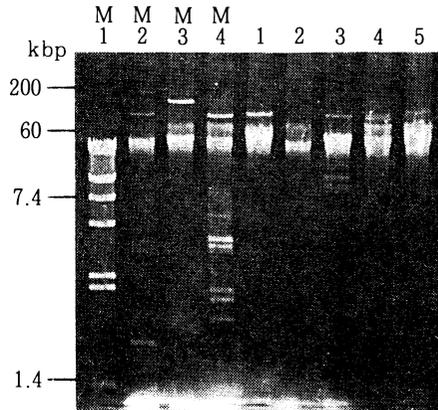
表5に食中毒由来S. Enteritidisの、表6には散発下痢症患者および健康保菌者由来S. Enteritidisの薬剤耐性パターンを示した。

食中毒由来株、散発下痢症患者および健康保菌者由来株は、1989年以降SM耐性株が大半を占めた。

食中毒由来株の薬剤耐性パターンをみると、1986年の1事例は検査した薬剤すべてに感受性、1987年の1事例はNA, PPA耐性株であった。しかし、1989年以降の9事例由来株はすべてSM耐性株で、そのうち2事例はSM, TC耐性であった。1987年のB食中毒では、患者から分離された株と原因食との牛刺し由来の株は同一の薬剤耐性パターンであった。

散発下痢症患者および健康保菌者由来株についてみると、食中毒由来株と同様に1988年以前はSM耐性株は認められなかったが、1989年以降は、SM耐性株の増加が顕著であり、SM単剤耐性株が62% (43株) を占めた。また、1991年は多剤耐性の傾向が認められた。

図1 食中毒由来株と散発下痢症由来株から分離された S. Enteritidis のプラスミド泳動パターン



- M1. マーカー (λ /Hind III digestion)
- M2. マーカー (S. Enteritidis L156 200, 60, 1.4kbp)
- M3. マーカー (Escherichia coli NRI 90kbp)
- M4. マーカー (Escherichia coli V517 7.4, 5.7, 5.2, 4.0, 3.1, 2.8, 2.2kbp)
- 1. A食中毒由来株 (60kbp)
- 2. H食中毒由来株 (プラスミドを保有しない株)
- 3. J食中毒由来株 (60, 8.7, 8.5kbp)
- 4. 1989年散発下痢症由来株 (60, 55kbp)
- 5. 1989年散発下痢症由来株 (66kbp)

表5 食中毒由来S. Enteritidisの薬剤耐性パターン

年	薬剤耐性パターン			
	SM	SM,TC	NA,PPA	感受性
1986				1
1987			1	
1989	3			
1991	4	1		
1992	1	1		
計	8	2	1	1

※ 1事例を1として記載した。

※ 1991年の4事例中1事例はSM耐性株とSM, TC耐性株が分離されたのでそれぞれ表に記載した。

表6 散発下痢症患者および健康保菌者由来 S. Enteritidis の薬剤耐性パターン (n=70)

年	薬剤耐性パターン							
	SM	NA	SM,TC	SM,NA	NA,PPA	KM,TC,NA,CP	感受性	
1986							4	
1987							1	
1988						1	1	
1989	14	1					6	
1990	16						4	
1991	13		2	1	3		4	
計	43(62)	1(1.4)	2(2.8)	1(1.4)	3(4.2)	1(1.4)	19	

1986年から1991年に千葉県で分離された*Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *Enteritidis*のプラスミドプロファイル、薬剤感受性およびファージ型について

4. プラスミドプロファイルと薬剤感受性の相互関係
食中毒由来株と散発下痢症由来株のプラスミドプロファイルと薬剤感受性の関係を表7, 8に示した。

表7に示すように、1986年と1987年の食中毒由来株は60kbpプラスミド単独保有で薬剤感受性あるいはNA, PPA耐性株であった。しかし、1989年以降の菌株は、すべてSM耐性で60kbpプラスミド単独保有株が多く分離され、さらに60kbpと8.7, 8.5kbpのプラスミドをもつ株も分離された。

散発下痢症患者および健康保菌者由来株では、表8に示すように1988年以前はすべて60kbpプラスミド単独保有で薬剤感受性株が主であった。しかし、1989年以降は60kbp単独保有でSM耐性株、60kbpと8.7, 8.5kbpのプラスミド保有株、さらに食中毒由来株にはなかった66kbpや60kbpと55kbpのプラスミド保有株など、60kbp単独保有株以外のSM耐性株が多く分離された。

表7 食中毒由来*S. Enteritidis*のプラスミドプロファイルと薬剤感受性の関係

プラスミドプロ ファイル(kbp)	薬剤耐性 パターン	年					計
		1986	1987	1989	1991	1992	
60	SM			3	4	1	7
	SM,TC				1		1
	NA,PPA 感受性	1	1				1
60,8.7,8.5	SM,TC					1	1
保有せず	SM				1		1

※1 事例を1として記載

表8 散発下痢症患者および健康保菌者由来*S. Enteritidis*のプラスミドプロファイルと薬剤感受性の関係

プラスミドプロ ファイル(kbp)	薬剤耐性 パターン	年					計	
		1986	1987	1988	1989	1990		1991
60	SM				7	11	12	30
	SM,NA						1	1
	NA,PPA						3	3
	KM,TC,NA,CP 感受性		1					1
66	SN				1			1
	NA				1			1
60,55	SM				5	5	1	11
60,8.7,8.5	SM,TC				1			1
保有せず	SM				1			1
	SM,TC						1	1
	感受性				1	2		3

IV. 考 察

千葉県では患者および保菌者から分離されたサルモネラの血清型は、1980年から1986年までは*S. Typhimurium*が主流であった。しかし、全国的に*S. Enteritidis*が流行した1989年以降は、それまで分離例が少なかった*S. Enteritidis*が県内でも急増した。

本菌の全国的な流行は、卵製品が原因であろうと報告^{2,3)}されている。1989年以降に千葉県で発生した食中毒も、原因食が卵製品と特定された事例は無いが、喫食状況調査ではいずれも卵製品が食されており、また、1992年のK食中毒では、納入元の液卵から*S. Enteritidis*が分離されたことなどを考えると、本菌による卵製品の汚染が広範囲に及んでいるものと考えられる。

千葉県内の食中毒由来株のプラスミドプロファイルは、今回の流行以前の牛刺しが原因と思われる2件の食中毒由来株も、1989年以降の事例から分離された由来株も共に60kbpプラスミド保有株であった。しかし、薬剤感受性をみると、流行前にはSM耐性株は分離されなかったが、流行後に分離された菌はほとんどがSM耐性株であった。一方、散発下痢症患者および健康保菌者由来株も60kbpプラスミド単独保有株が大半を占めたが、1989年からは60kbpと55kbpの両方のプラスミドを保有する株が認められた。薬剤感受性は、流行前に分離された菌はほとんどが薬剤感受性であったが、流行後はSM耐性を示す株が多く分離されるようになった。薬剤感受性の面からみると、流行前後の*S. Enteritidis*の由来は明らかに異なるものと考えられるが、さらに詳細な疫学的動向を探るためには、プラスミドの制限酵素による切断パターン等の調査が必要と思われる。また、散発下痢症由来株で食中毒由来株にはみられなかった60kbpと55kbpのプラスミドを保有する株が分離されたことは、複数の汚染源の存在が考えられ、今後の食中毒防止対策上注目していく必要があると思われる。

*S. Enteritidis*の病原因子の1つとして、36Mdのプラスミドを保有することが知られている⁷⁾が、この36Mdのプラスミドは60kbpのプラスミドと同様であるとの報告⁸⁾がある。今回の調査でも60kbpのプラスミドを保有する株が多数分離され、このプラスミドが病原因子である可能性が考えられる。しかし、60kbpのプラスミドを保有しない株も患者から分離されたことから、異なる病原因子の存在が示唆され、サルモネラの病原因子についてはさらに追求していく必要がある。

全国的にみると、1989年に分離された*S. Enteritidis*はファージ型34であったが、1990年以降はファージ型4

が流行の中心^{9,10)}であり、今回の調査でも同様の傾向であった。しかし、千葉県においては1989年はファージ型34で60kbpプラスミド単独保有株が分離されたが、ファージ型34で60kbpと55kbpのプラスミドを保有するものが多数分離されたという山梨県の報告⁹⁾あるいはファージ型34の株は60kbpと250kbpのプラスミドを保有したという東京都の報告¹⁰⁾とは異なっており、千葉県における本菌の汚染経路は非常に興味深いものである。

1991年のH食中毒において、60kbpプラスミド保有株とプラスミドを保有しない株が同時に分離されたが、薬剤感受性とファージ型が同じであったため、保存中にプラスミドが脱落したか、あるいは混合感染の可能性も考えられる。

疫学調査において、プラスミドプロファイルだけで菌株を分類することは十分でない場合もあるが、1987年のB食中毒において、患者由来の菌株と原因食であった牛刺し由来の菌株は同一のプラスミドプロファイル、薬剤耐性パターン、ファージ型を示した。このように複数の疫学マーカーを組み合わせて調べることは、疫学的調査に有用な方法であると思われる。

1989年以降分離されたS. Enteritidisは、プラスミドを保有しない株、60kbpとそれより小さいプラスミドを保有する株あるいは66kbpプラスミド単独保有株が検出された。さらに流行前に比べ多剤耐性を示す株が分離されており、今後のS. Enteritidisによる食中毒発生状況の動向に注目していく必要があると考えられる。

謝 辞

稿を終えるにあたり、ファージ型別をしていただいた国立予防衛生研究所の中村明子博士、プラスミドサイズマーカー菌株を分与して下さり実験のアドバイスをいただいた堀内三吉博士に深謝いたします。

なお、本研究は杏林大学の卒業研修の一環として千葉県衛生研究所において実施された。

参考文献

- 1) 仲西寿男 (1990) 卵とサルモネラ, 食品衛生研究, 40, 59-67.
- 2) 金子通治 (1991) : 1989年を中心にした散发下痢症患者由来サルモネラ血清型Enteritidisの疫学的解析, 感染症学雑誌, 5 : 1533-1539.
- 3) 病原微生物検出情報 (1990) : 11, 189-212.
- 4) Rivera, M.J., Rivera, N., Castillo, J., Rubio,

M.C. & Gomezlus, R. (1991) : Molecular and epidemiological study of salmonella clinical isolates. J. Clin. Microbiol., 29 : 927-932.

- 5) C.L. KADO AND S. -T. LIU (1981) : Rapid Procedure for Detection and Isolation of Large and Small Plasmids. J. Bacteriol., 145 : 1365-1373.
- 6) National Committee for Clinical Laboratory Standards (1990) : Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests, 4th Ed., 10(7) NCCLS, Villanova.
- 7) MASAYUKI NAKAMURA, SHIZUO SATO, TATSUO OHYA, SHOKO SUZUKI, AND SUMIO IKEDA (1985) : Possible Relation of a 36-Megadalton Salmonella Enteritidis Plasmid to Virulence in Mice. Infect. Immun., 47 : 831-833.
- 8) 田口真澄, 小林一寛, 杉山信子, 箕 福子, 安田和彦 (1992) : プラスミドプロファイルによる *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Enteritidis の型別の試み, 感染症学雑誌, 66 : 1067-1074.
- 9) 樋口淑子, 松井初江, 加藤容子, 後藤初代, 白石寛爾, 伊藤 隆 (1991) : 群馬県における *Salmonella* ser. Enteritidis について (第2報), 群馬県衛公研年報, 23 : 37-41.
- 10) 病原微生物検出情報 (1991) : 12, 72-73.
- 11) 吉田好文, 荒井建三, 中村憲久, 小川俊雄, 田村延一, 福田博保, 富樫哲也 (1992) : 東京都で多発して S. Enteritidis による食中毒事件などの疫学的解析結果, 食品衛生研究, 42, 59-65.