

## Salmonella Enteritidisの流行について

サルモネラはヒトに対して急性胃腸炎を引き起こす食中毒原因菌のひとつであり、また、乳幼児、小児における散発性下痢症の主要起因菌でもある。ここ数年来、欧米では、*Salmonella Enteritidis* (以下*S. Enteritidis*) による食中毒の発生頻度が増加し、その原因が*S. Enteritidis* で汚染された鶏卵によることが明らかになり、現在世界的に問題となっている。

我国でも1989年以降*S. Enteritidis* による食中毒が著しく増加し、その原因として鶏卵の関与が疑われる事例があいついでおり、鶏卵が普遍的な食品であることから、その社会的影響は大きく、早急な対応が求められている。そこで本稿では*S. Enteritidis* の流行について紹介する。

### 【*S. Enteritidis* の検出状況】

WHOの調査によれば1979～1987年の間に、35か国中24か国で*S. Enteritidis* の検出頻度が高まっている。たとえば、英国およびウェールズでの*S. Enteritidis* 感染症の報告は、1982年は1101例であったのが1987年は6858例と実に6倍に増加している。

我国でも1989年以降*S. Enteritidis* の検出頻度が増加している。図1に検出頻度の高いサルモネラ3菌種の検出数の年次推移を示した。1982年以降*Salmonella Typhimurium* が第一位を占めていたが、1989年には*S. Enteritidis* が検出数1347で首位となり、1982年以降の*S. Enteritidis* の平均検出数208と比較すると実に6.5倍に急増している。その後検出数は1990年に1033に下がったものの依然首位を占め、1991年には1388と再び増加した。

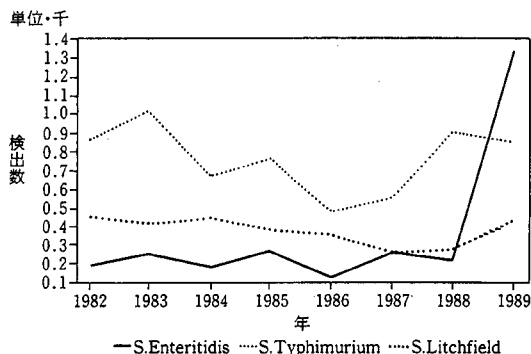


図1 サルモネラ上位血清型の年次別発生数 (中村 1991)

### 【*S. Enteritidis* による集団発生】

1985年頃から欧米を中心に増加傾向にあった*S. Enteritidis* による食中毒は、近年先進各国の間で急増している。英国では1988年のサルモネラ食中毒例の50%は、*S. Enteritidis* によるもので、原因食品として卵ないし卵製品の関与が明らかにされている。米国では、1985～1989年に発生した*S. Enteritidis* による食中毒は244事例で、患者数8607名中1094名が入院し、44名が死亡している。これらの事例のうち原因食品が判明した109例中89例(82%)で卵が関与したとされている。また、フランス、スペイン、オランダ、ドイツなどでも食中毒が多発している。これらの食中毒の原因食品としては、自家製マヨネーズ、オムレツ、タルタルソース、たまご酒、ミルクセーキ、ムース、アイスクリーム、卵サンドウィッチ、スコッチエッグなどがあげられる。

我国においても1989年以降*S. Enteritidis* による食中毒が著しく増加し、1989年には17都道府県で約60件に達している。表1は「病原微生物検出情報」に毎月掲載される「流行・集団発生に関する情報」から*S. Enteritidis* による患者数10名以上の集団発生をひろいだし規模別にまとめたものである。1989年は24件中23件が患者数149名未満の集団発生で、患者数は2188名であった。1990年は23件、1991年は21件の報告があり、件数では1989年とほぼ同じであったが患者数200名以上の大規模集団発生

表1 *S. Enteritidis* の集団発生 (10名以上)  
—規模別事件数— (中村 1991, 一部追加)

発生規模 (患者数)	発生年次			
	1989	1990	1991	1992
10～49	10	14	11	31
50～99	7	2	4	8
100～149	6	-	1	6
150～199	-	-	-	3
200～249	-	1	1	6
250～299	-	1	-	-
300～349	-	-	2	-
350～399	-	1	1	-
400～449	-	1	-	-
450～499	-	1	-	-
500～549	-	-	1	-
550～599	-	1	-	-
600～	1	1	-	1
件数合計 (患者数合計)	24 (2188)	23 (3477)	21* (2426)*	55 (5578)

注) \*:患者数が記載されていなかった1事例(横浜)を含みます

の件数が増加し、事件の大型化がうかがわれる。1992年には、さらに患者数10~49名規模の集団発生の増加も加わり件数は55件にのぼった。これらの事件のうち推定原因食品として、卵納豆、ババロア、ティラミス、シャーベット、シュークリーム、カスタードクリームなど、鶏卵が関与しているものが多くみられた。さらに、食中毒などの疫学的解析の手段として、国立予防衛生研究所で *S. Enteritidis* のファージ型別試験（後述）が実施されるようになり、その結果これらの推定原因食品由来株と患者由来株とが同一のファージ型を示し、その因果関係が明らかにされた事例がみられた。

#### 【ファージ型別による *S. Enteritidis* の疫学】

感染症発生時、その感染源対策を適確に行うためには、早期に感染源を特定することが重要となる。そのために種々の疫学マーカーが用いられるが、ファージ型別もそのひとつである。英国にあるWHO 腸内細菌ファージ型別センターでは、1987年に *S. Enteritidis* のファージ型別システムを確立し、1980年代後半から欧米で増加傾向にあった *S. Enteritidis* の流行を世界的な視野で監視してきた。その結果、英国におけるサルモネラ食中毒の76%は *S. Enteritidis* によるものでその80%がファージ4型であること、米国での主なファージ型は8および13a型であることなどが判明した。

我国でも1989年の *S. Enteritidis* の急増を機に、1990年3月にこのファージ型別が国立予防衛生研究所に導入され、14種のファージを用いて *S. Enteritidis* を47の型に型別することが可能となった。表2に食中毒事例から分離された *S. Enteritidis* のファージ型分布を示した。我国に分布している主なファージ型は1, 3, 4, 8, 9a, 11, 11b, 23, 34型などであるが、食中毒におけるファージ型分布は年によって異なっていた。8型は従来から我国に分布している型で、1988年以前の食中毒17件中9件(53%)を占めていた。1989年には34型が35件中17件(49%)を占め、この年の *S. Enteritidis* の急増は34型の流行によることが判明した。1990年および1991年は、4型がそれぞれ46件中26件(57%)、58件中25件(43%)と主流になり、

34型はそれぞれ12件(26%)、17件(29%)にとどまり、英国で猛威をふるっている4型が我国でも首位の座を占めた。1992年の流行菌型はひき続き4型で、41件中19件(46%)を占めているものの、34型が4件(9.8%)と大幅に減少し、かわって1型が11件(27%)と急増した。以上のファージ型のうち、4型および34型は鶏卵との関連が示唆されているので警戒すべきものと思われる。

ファージ型別は *S. Enteritidis* の疫学解析に有用であるが、最近、病原微生物検出情報にその問題点が提示された。国立予防衛生研究所においてファージ型別が実施された食中毒事例で、複数のファージ型が検出され、疫学調査では明らかに原因と推定される食品から患者と同じファージ型の菌が検出されなかったものがあり、その理由のひとつに、複数の集落を釣菌するか否かが関係すると思われるというのである。換言すれば、複数のファージ型菌の混合感染があった場合、食品あるいは患者の少なくとも一方からの分離株が極端に少ないと、双方のファージ型が一致しない事態が起こりうるということである。従って、食中毒の検査にあたっては、できるだけ多くの菌株を釣菌してファージ型別に供すること、またファージ型別を実施するまえに他の疫学マーカー、すなわち薬剤感受性パターン、プラスミドプロファイルなど、一般の検査室でも行える解析をスクリーニングとして行うなどの注意が必要と提言されている。

#### 【*S. Enteritidis* による鶏の感染と鶏卵の汚染】

現在知られている約2200のサルモネラの血清型のうち、約200種類のサルモネラが家禽から検出されている。ヒナ白痢の原因菌である *Salmonella Gallinarum* を除けば、そのほとんどは初生ヒナで時に致死的に作用するが、卵巣などへの侵襲性は低く、耐過鶏では盲腸などに保菌される程度である。しかし *S. Enteritidis* は、*Salmonella Typhimurium* や *Salmonella Heiderberg* と同様に低頻度ではあるが鶏の卵巣から検出されていた。しかも、成鶏が *S. Enteritidis* に感染してもほとんど無症状で産卵成績にも影響がみられず、また保菌卵は常時産出されるのではなく、特定の短時日に集中して産出される傾向があ

表2 我国における食中毒由来 *S. Enteritidis* のファージ型別分布  
(病原微生物検出情報 No. 155より)

年	ファージ型												検査事例数
	1	3	4	5a	8	9	9a	20a	23	34	UT	Mix	
1972-1988	-	-	2	1	9	-	-	1	1	1	2	-	17
1989	-	-	3	-	7	-	-	-	-	17	-	-	35
1990	2	-	26	-	2	-	1	-	-	12	-	3	46
1991	1	2	25	1	3	1	-	-	-	17	2	6	58
1992*	11	1	19	-	2	3	-	-	-	4	-	1	41
	14	3	75	2	23	4	1	1	1	51	4	18	197

注) \*:1-10月 UT:既知のすべてのファージ型に感受性のないもの  
Mix:複数のファージ型が検出された事例

るといわれている。*S. Enteritidis* の鶏への感染経路には、介卵感染、飼料および環境からの感染などが考えられる。介卵感染はイン・エッグ、すなわち母鶏の卵巣などに保菌されている *S. Enteritidis* が卵内に移行するものと、オン・エッグ、すなわち卵殻表面に付着した菌が卵の内部に侵入するものとに分けられる。また、サルモネラは乾燥に強く、羽毛、糞便、塵埃中で数か月以上生存するので、環境からの感染も無視できない。しかし、飼料からの検出率は低く、最近の *S. Enteritidis* の流行要因としては重要でないとの意見もある。

鶏からの *S. Enteritidis* の検出状況を見ると、英国では1987年以降検出頻度が急増し、1989年には家禽由来サルモネラの48.2%に達し、その79%はフェージ4型であった。このような検出率の増加は米国、オランダなどでもみられており、感染鶏の処分や生産卵の販売禁止などの処置が行われている。我国では、1988年以降に輸入ブローラー種鶏およびその後代鶏から *S. Enteritidis* (フェージ4型) が検出され、その後秋田県、青森県などで食中毒原因卵を生産したと推定された養鶏場の卵から、患者由来株と同じフェージ型の *S. Enteritidis* が検出された事例がみられた。しかし、市場に出回っている鶏卵から汚染卵をみつけるのは至難であり、米国における調査によれば、汚染卵は1万個に1個の割合であったという。卵の部位別汚染状況を見ると、卵内と卵殻の汚染はほぼ同率で起こり、卵内での保菌は卵黄よりも卵白での頻度が高いことが指摘されている。卵の中での *S. Enteritidis* の増殖についてみると、自然感染鶏から産出される保菌卵中の *S. Enteritidis* の菌数は10個以下にすぎないが、室温で放置すれば増殖し、実験的には10個の菌を卵黄内に接種し室温で2日間放置したところ、卵黄内の菌数が10億個( $10^9$ )に達したという報告がある。

#### 【対策】

*S. Enteritidis* の流行に対する対策は、鶏の *S. Enteritidis* 感染症対策と、鶏卵の流通・加工・調理に対する対策のふたつに大別される。

鶏の *S. Enteritidis* 感染症対策として、汚染されていない種鶏群の確立、汚染のない飼料の使用、環境からの感染予防の3項目が、WHOの緊急会議において提示された。種鶏群の清浄化は保菌鶏の摘発と淘汰によって行われる。*S. Enteritidis* は、*Salmonella Gallinarum* と共通のO抗原(9,12)を持つので、ひな白痢の全血急速凝集反応を応用した保菌鶏の摘発が可能であるが、その30%しか検出し得ず、他に *S. Enteritidis* からの抽出抗原を用いて感染鶏のIgG抗体を検出する方法も報告されているが、やはりすべての保菌鶏を検出することはできない。

そこで、今のところ直接 *S. Enteritidis* を分離する方法がとられている。欧米では、法により *S. Enteritidis* の検査、陽性鶏群の処分、卵の食卓卵としての販売の禁止などが行われている。また、輸入ヒナの検疫も行われ、我国でも1991年から輸入ヒナの全ロットについてサルモネラの検査が行われ、保菌ヒナの導入が規制されている。

鶏卵の流通・加工・調理に対する対策としては、前述のように2日間の室温放置で卵黄内の *S. Enteritidis* が  $10^9$  個に増殖したという報告や、8℃以下では卵内で *S. Enteritidis* が増殖できないという報告などから、鶏卵の流通は8℃以下で行うべきだという意見がある。*S. Enteritidis* の卵の中での熱抵抗性はサルモネラの中では比較的強く、55℃で90%の菌を死滅させるのに、乳化した全卵では6分であったが、卵黄内に1000個の菌を接種した場合は7分間煮沸しても菌が生きたという報告がある。また、調理法によっても *S. Enteritidis* の殺菌時間は異なり、卵に  $10^5$ /mlの割合で接種した場合、いり卵で1分、目玉焼きで7分(蓋なし片面加熱)という報告があり、調理においては十分に加熱することが望ましいと思われる。

#### 【むすび】

近年、先進諸国で問題となっている *S. Enteritidis* によって汚染された鶏卵による食中毒が我国でも流行している。鶏卵は普遍的な食品であり、とくに我国では生食の習慣もあるので、その社会的影響は大きく早急な対応が望まれる。

#### 【参考文献】

- 1) 中村明子：サルモネラ・エンテリティディスの疫学について，食品衛生研究，41，17-28，1991
- 2) 佐藤静夫：鶏の *Salmonella Enteritidis* 感染症，モダンメディア，37，481-496，1991
- 3) Sharp, J. C. M. : Salmonellosis and eggs, Brit. Med. J., 297, 1557-1558, 1998
- 4) 国立予防衛生研究所、厚生省保険医療局疾病対策課結核・感染症対策室：流行・集団発生に関する情報，病原微生物検出情報，No. 134-157，1991-1993
- 5) 国立予防衛生研究所、厚生省保険医療局疾病対策課結核・感染症対策室：〈特集〉サルモネラ・エンテリティディス流行1989~1992. 10，病原微生物検出情報，No. 155，1-2，1993
- 6) 国立予防衛生研究所、厚生省保険医療局疾病対策課結核・感染症対策室：〈情報〉*Salmonella Enteritidis* のフェージ型別による疫学解析上の問題点，病原微生物検出情報，No. 155，3-4，1993

(細菌部 石原政光)

## 水道水の変異原性試験

(はじめに)

1970年代にアメリカの水道水中に発ガン物質であるトリハロメタンが検出された。これは水中の有機物が浄水処理や消毒で使用される塩素と反応して生成したものである。その後の研究によりトリハロメタン以外にもアルデヒド類、ハロ酢酸、ハロアセトニトリル等の有害な消毒副生成物が生成する事が明らかとなった。一方、各種産業の発展に伴って多種多様な化学物質が生み出され、これら化学物質により水道原水が微量ではあるが汚染されていることも明らかとなった。この様な状況下で厚生省は平成4年12月21日に水道水の安全性を確保するために水質基準の改正を行い、基準項目を26項目から46項目に拡充強化した。また厚生省は同じ日に水質基準を補完する項目として快適水質項目13項目及び監視項目26項目を示した。

快適水質項目は、おいしい水などより質の高い水道水を供給するための項目であり、監視項目は現状では水質基準とする必要はないが、将来にわたって安全性を確保するために監視を必要とする項目である。このように今回の改正により85項目について基準が示されたが、数多く存在する化学物質すべてに基準を設けるには困難が伴い、異なる化学物質間の相互作用により毒性が発現する場合もある。この様な微量化学物質が共存する状態で水道水の安全性を総合的に評価する方法として変異原性試験をはじめとする毒性試験の応用が検討されているので紹介する。

### 1. 毒性試験の応用について

#### (1) 変異原性試験

一口に毒性試験といっても表1<sup>1)</sup>に示す通り多種多様なものが存在する。トリハロメタン等の発ガン物質の存在や、次世代に影響を及ぼす遺伝毒性などの観点から発ガン性試験があるが、その中でも変異原性試験を中心に

検討が行われている。変異原性試験は化学物質の発ガン性短期スクリーニング法として開発されたもので、突然変異を検出する方法である。表2に代表的な変異原性試験方法を示したが、一番よく知られているのがAmes試験である<sup>2)</sup>。Ames試験はカリフォルニア大学のB. N. Ames博士が開発した方法でネズミチフス菌(*Salmonella typhimurium*) TA100株とTA98株を主に用いて突然変異原性を検出する方法である。これらの菌株はヒスチジン合成酵素の遺伝子に突然変異が起きていて、培地中にヒスチジンがないと増殖できないヒスチジン要求性(His<sup>-</sup>)の変異株である<sup>3)</sup>。化学物質の作用によりHis<sup>-</sup>がヒスチジン非要求性(His<sup>+</sup>)となる復帰突然変異をプレート上のコロニー数を数えて判定する方法である。

生体内に吸収された化学物質は、酵素によって代謝され、当初とは異なった化合物に変化する。変異原性物質も生体内では同様に代謝されるものと考えられる。変異原性物質の内でもそのまま変異原性を有しDNAと反応するものもあるが、多くは動物体内で代謝を受けて初めて変異原性を示す。微生物にはこれらの化学物質を代謝活性化する薬物代謝酵素を欠くものが多い。そこで生体内で代謝された化学物質の変異原性をみるためにフェノバルビタールと5,6-ベンゾフラボン等を投与して薬物代謝酵素を誘導した動物(主にラット)の肝臓ホモジネートを遠心分離(9000g)した上清分画(S-9 mix)を用いて化学物質を処理し、これに菌を作用させてから寒天培地に注ぎ、一定時間後にプレート上のコロニー数を数える方法が採られている。具体的な方法を表3に示す<sup>4)</sup>。

この試験方法を用いた検討例は多く、T. Vartiainenは

表3 Ames試験の試験操作

1. 滅菌した小試験管に試料溶液を入れる。
2. 0.1Mリン酸緩衝液(pH7.4) 0.5ml又はS-9 mix 0.5 mlを加える。
3. あらかじめ培養しておいたテスト菌懸濁液0.1mlを加える。
4. よく混和後、37°Cの恒温水槽で20分間毎分100~120往復で振とうする。
5. 45~50°Cに保温したトップアガー2mlを加える。
6. 気泡を生じないように注意して素速く混合する。
7. 最少グルコース寒天平板培地に注ぎ一様に広げる。
8. トップアガーが固まるまで水平な机の上に放置する。
9. プレートを上下転倒して、37°Cで48時間インキュベートする。
10. 復帰突然変異を起こしたコロニー数を計測する。

表1 毒性試験の種類

1. 一般毒性試験
  - 1) 急性毒性試験
  - 2) 短期毒性試験(亜急性毒性試験)
  - 3) 長期毒性試験(慢性毒性試験)
2. 特殊毒性試験
  - 1) 局所刺激試験
  - 2) アレルギー性試験
  - 3) 催奇形性試験
  - 4) 繁殖試験
  - 5) 依存性試験
  - 6) 発ガン性試験(変異原性試験)

表2 代表的な変異原性試験

1. 遺伝子突然変異を指標とするもの  
Ames試験
2. DNA損傷を指標とするもの  
Rec-assay, Umu-テスト
3. 染色体異常を指標とするもの  
培養細胞を用いる染色体異常試験  
マウスを用いる小核試験

東フィンランドのKuopio市の、H. J. Koolらはオランダの18市のうち13市の飲料水より変異原性を検出した。日本では、亀井らがフミン質を多量に含む石狩泥炭地帯の井戸水の塩素消毒による変異原性を検討し、過剰な塩素処理により変異原性が増加した事を示した<sup>6)</sup>。また浦野<sup>6)</sup>、木苗<sup>7)</sup>、中室<sup>8)</sup>は各都市の水道水について変異原性を調査している。

## (2) 培養細胞を用いた毒性試験

変異原性試験などは特殊毒性試験に属するのに対し、一般毒性試験については細胞毒性試験が検討されている。この方法は実験動物を用いるよりも安価で、迅速な簡易スクリーニング法である。細胞の増殖抑制の機序には細胞分裂が阻止されるために生じるものと、染色体異常により生じるものの2種類がある。変異原性などは後者の機序によるものであるから、培養細胞を用いる方法により得られた結果は変異原性試験などの結果と必ずしも相関があるとは限らない。また培養細胞は均一で増殖が速く、取扱いやすいのが利点であるが、継代を重ねると本来の親細胞の機能を失う事があるので注意が必要である。この方法は対数増殖期の細胞に試料を加え、一定時間培養した後、細胞数の変化やある種の酵素量の変化などを測定することにより毒性を判定するものである。この測定系を用いた検討例はあまりないが、内海<sup>9)</sup>がヒト白血病患者より樹立したHL-60細胞を用い、川合<sup>10)</sup>はほ乳動物細胞株3株、魚類細胞株2株を用いて細胞増殖抑制で水中の化学物質の毒性を検討している。

## 2. 水中よりの毒性物質の回収

水中の毒性物質は存在しているとしても非常に希薄であるので前処理を施して濃縮し、試料とする必要がある。濃縮分離方法の主なものについて以下に述べる<sup>11)</sup>。

### (1) XAD樹脂濃縮法

スチレンとジビニルベンゼンまたはアクリルエステルを重合して作られるXAD樹脂は大量の水試料より不極性から極性の弱い不揮発性有機物の回収に適している。また水試料のpH調節により酸性、中性、塩基性物質を分別回収する事もできる。一般によく用いられる方法であるが、使用前の樹脂の洗浄にかなり手間がかかる。最近、洗浄が簡易なスチレン-ジビニルベンゼン重合体のCSP-800と陰イオン交換基を導入したCHPA-25の2種類の樹脂を組み合わせるとXAD樹脂よりもよい回収率が得られるという報告がある<sup>12)</sup>。

### (2) 溶媒抽出法

有機溶媒を用いて水中の不揮発性有機物を抽出濃縮する。ヘキサン、ベンゼン、ジクロロメタン等で非極性、中極性有機物が、酢酸エチルで一部の極性有機物が回収

できる。水試料のpHの調節により液性別の分別回収も可能である。この方法は大量の水試料よりの濃縮には適さない。

### (3) 凍結乾燥法

水中に存在する不揮発性の無機物と有機物を全て回収できるが、共存する無機物が変異原性試験で妨害を示す事がある。

### (4) ブルーレイオンカラム法

銅フタロシアニントリスルホン酸をレイオンに共有結合で固着させたものでベンゾ(a)ピレンを代表とする平面構造を有する3環以上の多環芳香族炭化水素類の吸着に優れている。メタノール-アンモニア混液で容易に脱着できるが、回収できる対象物が限定される。

### (おわりに)

水道水中の化学物質の毒性試験は方法論はほぼ完成されたと思われるが、低濃度であるが故に毒性試験で得られた結果をヒトにどのように外挿し、評価するかはまだ手探りの段階である。その評価方法を確立することが今後の課題である。

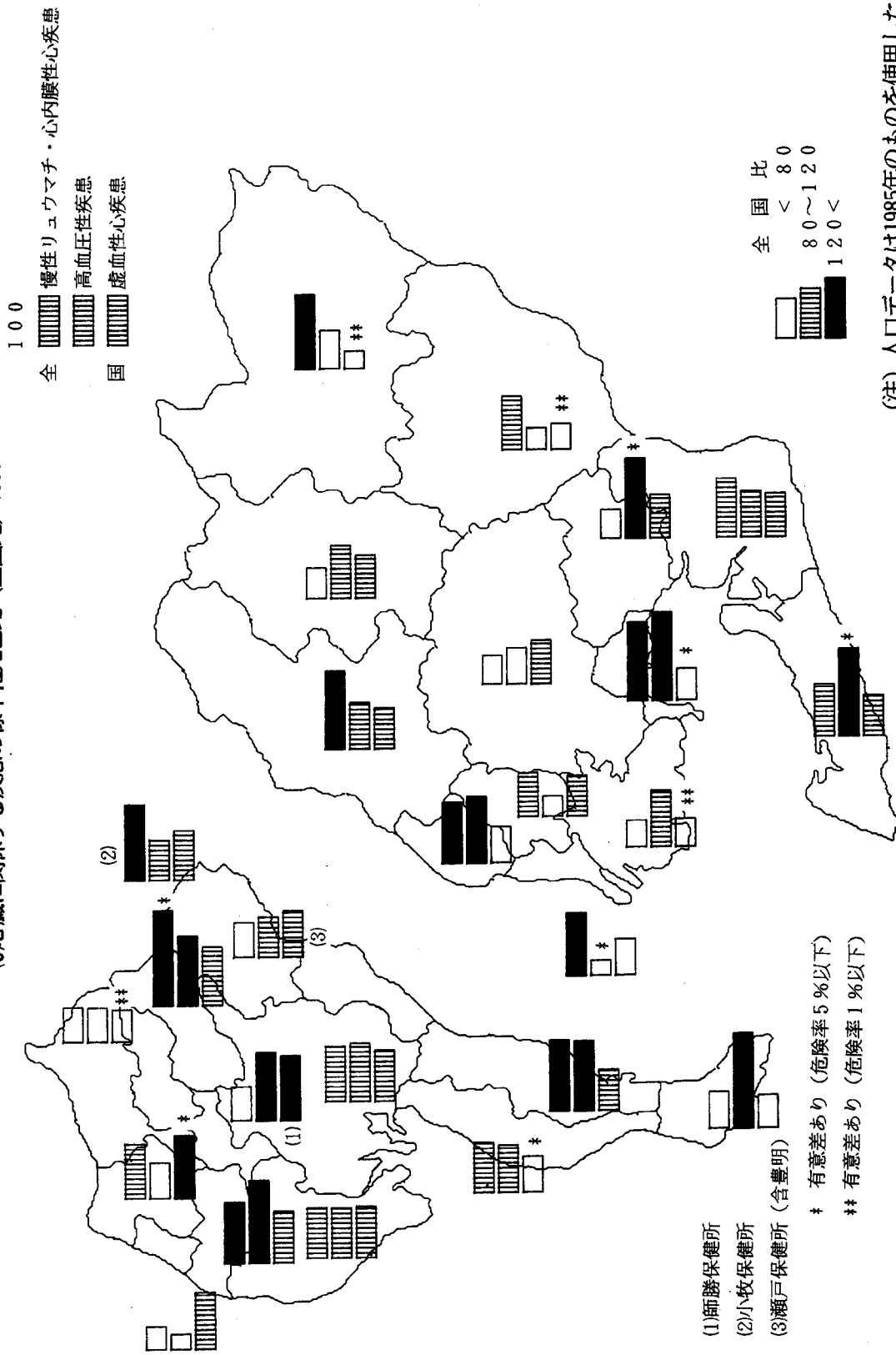
### 参考文献

- 1) 安藤正典：水道協会雑誌， 557， 67-70， 1981
- 2) 労働省化学物質調査課編：安衛法における変異原性試験，中央労働災害防止協会，1991
- 3) 早津彦哉編：化学と生物 実験ライン3 変異原物質試験法，広川書店，15-35，1991
- 4) 石館基編：毒性試験講座12 変異原性，遺伝毒性，地人書館，31-42，1991
- 5) 浦野紘平：用水と廃水， 33， 711-724， 1991
- 6) 浦野紘平ら：第27回日本水環境学会年会講演集， 456-457， 1993
- 7) 木苗直秀：第20回日本水環境学会セミナー 化学物質による環境汚染の現状と今後の動向（第3回）講演資料集， 125-139， 1991
- 8) 中室克彦ら：第26回日本水環境学会年会講演集， 500-501， 1992
- 9) 内海英雄：第20回日本水環境学会セミナー 化学物質による環境汚染の現状と今後の動向（第3回）講演資料集， 112-124， 1991
- 10) 川合真一郎：第26回日本水環境学会年会講演集， 494-495， 1992
- 11) 日本薬学会：日本薬学会第112年会公衆衛生協議会資料， 33-35， 1992
- 12) 浦野紘平ら：第25回日本水環境学会年会講演集， 204-205， 1991

(生活環境部 佐藤克彦)

〔1〕 地域特異性

(9)心臓に関する疾患の標準化死亡率(全国比) 1990



(注)人口データは1985年のものを使用した  
(厚生省地域保健医療計画支援システムより)  
(保健情報室)

この図を見てご意見・ご感想などありましたら、ご連絡下さい。