

広島県衛生研究所研究報告

第31号

1984年12月

目 次

原 著

- ゆで卵中における *Staphylococcus aureus* のエンテロトキシンA、B
およびC産生の検討
福田 伸治, 岸本 敬之…………… 1
- 生薬の変異原性と亜硝酸処理によるその活性の変化
水田 満里…………… 5
- 広島県下の某小学校で発生した *Campylobacter jejuni*
による集団食中毒事例
佐々木実己子, 岸本 敬之, 得能 弘志,
小川 博美, 福田 伸治…………… 13

資 料

- 広島県内医療機関における病原細菌検出状況(1982—1983年)
広島県臨床細菌研究会…………… 25
- 広島県湯来町住民における横川吸虫感染状況
古本 暁美, 松尾 健, 仁王頭 敏…………… 31
- Salmonella nagoya* と *Klebsiella oxytoca* の混合汚染による食中毒事例
小川 博美, 岸本 敬之, 得能 弘志,
佐々木実己子, 福田 伸治…………… 35
- 粉チーズに混入された粉石鹸の脂肪酸組成比による同定
穂下 誠彦…………… 45
- 醤油中の安息香酸の分析
松尾 健, 頼光 彰子, 金廣美智子,
金森 久幸, 坂本 征則…………… 47
- 他誌掲載論文要約(1983年11月~1984年10月)…………… 50

広島県衛生研究所

[734] 広島市南区宇品神田1丁目5-70



ゆで卵中における *Staphylococcus aureus* の エンテロトキシンA, BおよびC産生の検討

福田伸治* 岸本敬之*

Experimental Production of Staphylococcal Enterotoxins A, B and C in Hard-boiled Eggs

SHINJI FUKUDA AND TAKASHI KISHIMOTO

(Received Sept. 26, 1984)

Production of staphylococcal enterotoxins A, B and C after 24 h of incubation at 37°C in several egg media was studied. The solid whole egg and egg yolk media in petri dishes, as well as the whole egg and egg yolk suspension media in tubes with shaking, provided the good environment for production of relatively large quantities of enterotoxins A, B and C. On the other hand, the solid egg white medium in petri dish was less sufficient for production of enterotoxins A, B and C, but the egg white suspension medium in tube with shaking supported production of relatively large quantities of enterotoxins A, B and C.

Key words: Staphylococcal enterotoxins, Whole egg, Egg yolk, Egg white.

緒言

ブドウ球菌食中毒は、*Staphylococcus aureus* が食品中で産生したエンテロトキシンを食品とともに摂取して発生する毒素型食中毒である。

わが国におけるブドウ球菌食中毒の原因食品をみると、主食である“おにぎり”などの米飯食品がその大半を占めている。Shinagawaら〔13〕は実験的に米飯培地を用いて *S. aureus* のエンテロトキシン産生を検討し、意外に多量のエンテロトキシンが産生されたことから、米飯は *S. aureus* のエンテロトキシン産生に適した食品であることを報告し、これを立証している。

一方、古くから献立の一つに必ずといってよいほど用いられる卵類およびその加工品を食中毒原因食品の観点からみても、昭和51年から58年の8年間に全国で発生をみた細菌性食中毒5851事例のうちこれが原因食品となったのは134事例とわずか2.3%を占めているにすぎない。

しかし、その原因菌となると、56.0% (75/134) が *S. aureus* によるものであり（厚生省環境衛生局食品衛生課：食中毒発生状況，食品衛生研究，1977—1984年），卵類およびその加工品に分類されていない卵製品を使用した食品，菓子類などをも考慮すると，卵類とブドウ球菌食中毒とのかかわりはかなり強いものと推測される。

そこで，著者らはゆで鶏卵を用い，実験的に *S. aureus* のエンテロトキシン産生について検討し，若干の知見を得たので報告する。

材料および方法

1. 使用菌株

S. aureus FRI722 (エンテロトキシンA産生株)，*S. aureus* 243 (エンテロトキシンB)，*S. aureus* 493 (エンテロトキシンC)および当初にて食中毒原因究明に際し，その原因菌として分離した *S. aureus* 6株 (エンテロトキシンA：4株，エンテロトキシンA+B：1株，エン

* 広島県衛生研究所：Hiroshima Prefectural Institute of Public Health.

テロトキシンA+C:1株)の計9株を使用した。

2. エンテロトキシン産生試験

ゆで全卵(卵黄と卵白を混ぜ合わせたもの)、卵黄および卵白における *S. aureus* のエンテロトキシン産生の検討は次の2法により実施した。

1) 卵固型培地(平板法)によるエンテロトキシン産生試験

全卵、卵黄および卵白をそれぞれ30mlづつペトリ皿に分注後、115°C、15分間高圧滅菌し固型培地を作製した。作製した培地は室温まで冷却した後、Brain heart infusion broth (BHI, BBL) の1夜培養液の0.2mlをそれぞれ平板表面に接種し、37°C、24時間静置培養した。対照培地としては0.7%寒天加BHI〔3〕を用いた。

エンテロトキシンの検出は、平板内容全体をかきとり4倍量の生理食塩水を加えてスマッカーにて混釈後、1400rpm、20分間高速遠心分離し、その上清を用いて逆受身ラテックス凝集反応(RPLA, デンカ生研)により実施した(2倍段階希釈)。なお、RPLAにおけるエンテロトキシン最小検出量は添付説明書の記載により0.002 µg/mlとして計算した。

2) 卵浮遊培地(試験管法)によるエンテロトキシン産生試験

通常の方法でゆで卵を作製し、全卵、卵黄および卵白に分け、それぞれ細かくすりつぶし蒸留水で3倍量に増量した後、その均等液の7mlを試験管(18×180mm)に分注し、115°C、15分間高圧滅菌し卵浮遊培地を作製した。作製した培地は固型培地と同様冷却後、BHIの1

夜培養液の0.2mlを接種し、37°Cの恒温水槽中に試験管を傾斜させて設置し、24時間振とう培養(120rpm)した。対照培地としてはBHIを用いた。

エンテロトキシンの検出は固型培地と同様、遠心上清を用いてRPLAにより実施した(10倍段階希釈)。

結果および考察

卵固型培地および卵浮遊培地における *S. aureus* 9株のエンテロトキシンA、BおよびC産生量は表1および表2に示した。

ゆで全卵および卵黄を用いた場合は、固型培地および浮遊培地ともに比較的多量のエンテロトキシンA、BおよびC産生が認められた。これらにおいて産生されたエンテロトキシン量は、BHIにおいて産生された量と比較すると少ない量であったが、ヒトの最小発症量が約1 µg/ヒトである〔1〕ことからすると、ブドウ球菌食中毒発生に十分であると考えられ、ゆで全卵および卵黄は *S. aureus* のエンテロトキシン産生に好適な培地となるものと考えられた。綿糸卵および厚焼き卵などの卵加工品は今回の実験の全卵を用いた場合に相当し、これら卵焼きもブドウ球菌食中毒の原因食品となる可能性の高いことが推察された。

一方、ゆで卵白を用いた場合は、浮遊培地において比較的多量のエンテロトキシンA、BおよびCの産生をみたが、固型培地においては、比較的少量のエンテロトキシン産生能を有する株(3株)がエンテロトキシンAおよびBを産生したのみで、その産生量も *S. aureus* の発育の遅延と平行して少ないものであった。

Table 1. Enterotoxin production of the 9 strains of *Staphylococcus aureus* on solid egg media in petri dishes

Strain	Enterotoxin type	Concentration of enterotoxin (µg/g)			
		Whole egg	Egg yolk	Egg white	BHI*
FRI722	A	1.28	1.28	0.01	>10.24
810818	A	0.32	0.08	—	0.32
811024	A	0.08	0.08	—	2.56
820626	A	0.64	0.16	0.01	5.12
820820	A	0.64	0.16	—	5.12
820827	A	0.32	—	—	1.28
	B	2.56	0.16	—	>10.24
810706	A	0.64	0.64	—	1.28
	C	1.28	1.28	—	5.12
243	B	>10.24	>10.24	0.08	>10.24
493	C	1.28	0.16	—	5.12

* Brain heart infusion broth containing 0.7% agar (Casman & Bennett, 1963).

Table 2. Enterotoxin production of the 9 strains of *Staphylococcus aureus* in egg suspension media in tubes with shaking

Strain	Enterotoxin type	Concentration of enterotoxin ($\mu\text{g/ml}$)			
		Whole egg	Egg yolk	Egg white	BHI
FRI 722	A	0.2	2.0	2.0	20.0
810818	A	0.2	0.02	0.2	0.2
811024	A	0.2	0.2	0.02	2.0
820626	A	0.2	0.2	0.2	2.0
820820	A	0.02	0.02	0.2	0.2
820827	A	0.2	0.2	0.02	0.2
	B	0.02	0.02	0.2	2.0
810706	A	0.2	0.2	0.2	0.2
	C	0.2	0.2	2.0	2.0
243	B	0.2	2.0	2.0	20.0
493	C	0.2	0.02	2.0	20.0

S. aureus の発育にはビタミンB₁およびニコチン酸の存在が不可欠であり〔4, 9〕, また無機質イオン (Fe²⁺, Mg²⁺, K⁺, PO₄³⁻) の存在はエンテロトキシン (とくにエンテロトキシンB) 産生を助長することが報告されている〔8, 10〕. 1983年版日本食品標準成分表〔7〕によると, 卵白はこれらビタミン類および無機質の含有量が全卵および卵黄と比較して少なく, これら成分の総合的欠除が *S. aureus* の発育を遅延させ, エンテロトキシン産生を抑制する一つの原因になるものと考えられる. それゆえ, 卵白のみを使用した食品および卵黄が卵白に包まれたゆで卵の場合は, 全卵および卵黄を使用した食品と比較してブドウ球菌食中毒の原因食品となる可能性は低いものと予想される.

しかし, Harbrechtら〔6〕はゆで卵の気室に *S. aureus* を接種しエンテロトキシン産生を検討した結果, とくにエンテロトキシンB産生株の1卵当りのエンテロトキシン産生量はブドウ球菌食中毒を発生させるのに十分であったと報告しており, 多量のエンテロトキシン産生能を有する株により高濃度に汚染されたならば, ゆで卵白もブドウ球菌食中毒の原因食品となりうることも考えられる. 実際, 本実験において比較的少量のエンテロトキシン産生能を有する株によりエンテロトキシンAおよびBの産生をみたことは, ゆで卵白がブドウ球菌食中毒の原因食品として完全に否定できないことを物語っている.

また, Nathら〔11〕およびYadavら〔15〕は生卵白に蒸留水, 鉄および卵黄などを添加すると *Pseudomonas fluorescens*, *Escherichia coli* および *Salmonella typhi* の発育が助長されたと報告しており, 卵白浮遊培地において対比培地と同様比較的少量のエンテロトキシンA, B

およびC産生を認めたことは, 振とう培養による *S. aureus* の発育, エンテロトキシン産生の促進〔5〕とともに蒸留水添加の効果が発揮されたものと推察される. 従って, 卵白自体も何らかの処理および栄養源の添加などが行われたならば, *S. aureus* のエンテロトキシン産生に好適な着地となるものと予想される.

以上のごとく, 熱凝固された卵, とくに全卵および卵黄はそれ自体で *S. aureus* のエンテロトキシン産生に好適な食品であることが明らかとなったが, 食中毒発生因子として最も大きなウエイトを占めるのは, 不適当な保存, とくに室温放置である〔2, 12, 14〕ことから, 卵製品の保存・取扱いに際しては, 低温保持による *S. aureus* の発育とエンテロトキシン産生の防止が肝要である.

要 約

卵培地中における *S. aureus* のエンテロトキシンA, BおよびC産生を検討した. エンテロトキシン産生量の測定は37°C, 24時間培養後に行った. 全卵および卵黄固型培地では比較的少量のエンテロトキシンA, BおよびCが産生され, *S. aureus* のエンテロトキシン産生に適した培地であった. また, これは, 全卵および卵黄浮遊培地においても同様であった. 一方, 卵白固型培地は *S. aureus* のエンテロトキシンA, BおよびC産生に十分な培地ではなかったが, 卵白浮遊培地においては比較的少量のエンテロトキシンA, BおよびCが産生された.

本論文の要旨は第42回日本公衆衛生学会総会 (1983年11月, 横浜市) において発表した.

Table 1. List of crude drugs tested for mutagenicity

Crude drug	Japanese name		
Lycii Cortex Radicis	Jikoppi (地骨皮)	Lauri Folium	Gekkeiyo (月桂葉)
Galla	Gobaishi (五倍子) (K) ^{a)}	Cassia angustifolia	Sennayo (センナ葉)
Meliae Cortex	Kurenpi (苦楝皮)	Uvae Ursi Folium	Uwawurushi (ウワウルシ) (K)
Phellodendri Cortex	Oobaku (黄 柏) (K)	Artemisiae capillaris Flos	Inchinko (和茵陳蒿) (K)
Cinamomi Cortex	Keihi (桂 皮) (K)	Inulae Flos	Kinsenno (金盞草)
Dictamni Radicis Cortex	Hakusenhi (白鮮皮)	Chamomillae Flos	Kamitsure (カミツレ) (K)
Magnoliae Cortex	Wakooboku (和厚朴) (K)	Eugenia caryophyllata	Chooji (丁 字) (K)
Myricae Cortex	Yoobaihi (楊梅皮) (K)	Xanthii Fructus	Sooji (蒼 耳)
Cinchonae Cortex	Quina	Gardeniae Fructus	Sanshishi (山梔子)
Picrasmae Lignum	Kuboku (苦 木)	Forsythiae Fructus	Rengyo (連 翹)
Akebiae Lignum	Mokutsu (木 通)	Foeniculi Fructus	Uikyō (茴 香) (K)
Seppan Lignum	Senboku (蘇 木) (K)	Quisqualis Fructus	Shikunshi (使君子)
Atractylodes Rhizoma	Sojutsu (蒼 朮) (K)	Actinidiae Fructus	Mokutenryo (木天蓼)
Atractylodes japonica	Byakujutsu (白 朮) (K)	Aurantii ericarpium	Toohi (橙 皮)
Cnidii Rhizoma	Senkyuu (川 芎) (K)	Aurantii immaturi Fructus	Kijitsu (枳 実)
Panacis Rhizoma	Tikusetsuninjin (竹節人參)	Evodiae Fructus	Goshuyu (呉朱黄)
Corydalis Tuber	Engosaku (延胡索)	Zanthoxyli Fructus	Sansho (山 椒)
Coptidis Rhizoma	Ooren (黄 連) (K)	Nandinae Fructus	Hakunanten (白南天)
Nupharis Rhizoma	Senkotsu (川 骨)	Anisi stellati Fructus	Daiuikyo (大茴香)
Rhei Rhizoma	Daio (大 黄) (K)	Cardamomi Fructus	Shozuku (小豆蔻) (K)
Curcumae Rhizoma	Ukon (う 金)	Plantaginis Semen	Shazenshi (車前子)
Zedoariae Rhizoma	Gajutsu (我 朮)	Gleditschiae Semen	Sokakushi (皂角子)
Hedychii Rhizoma	Sanna (山 奈) (K)	Armeniaca Semen	Kyonin (杏 仁)
Zingiberis Rhizoma	Shookyo (生 姜)	Arecae Semen	Binroshi (檳榔子) (K)
Zingiberis Siccatum Rhizoma	Kankyo (乾 姜)	Coicis Semen	Yokuinin (薏苡仁)
Astragalus huantchy	Oogi (黄 耆)	Cycatis Semen	Sotetsuzitsu (蘇鉄実)
Salviae Radix	Tanjin (丹 参) (K)	Myristicae Semen	Nikuzuku (肉豆蔻) (K)
Scutellariae Radix	Oogon (黄 芩) (K)	Eupatorii Herba	Rans (蘭 草)
Gentianae scabrae Radix	Ryuutan (龍 胆)	Swertiae Herba	Tooyaku (Senburi) (当薬) (センブリ)
Bupleuri Radix	Saiko (柴 胡)	Geranii Herba	Gennoshoko (ゲンノショウコ)
Bletilla stricta	Byakugyuu (白 及)	Hypericum ascyron	Otogiriso (弟切草)
Ligustici Radix	Tooki (当 帰)	Ephedrae Herba	Maoo (麻 黄) (K)
Euchrestae Radix	Sanzukon (山豆根)	Digenea	Kaininso (海人草)
Sinomenii Radix	Booi (防 已)	Aloe	Aroe (アロエ) (K)
Paeoniae Radix	Shakuyaku (芍 薬) (K)	Uncaria gambir	Asenyaku (阿仙薬)
Asiasari Radix	Saishin (細 辛) (K)		
Sophorae Radix	Kujin (苦 参) (K)		
Angelicae Radix	Daishintooki (大深当帰)		
Phynchophylla	Chootooko (釣藤鈎)		
Perillae Folium	Shisoyo (紫蘇葉)		
Hydrangeae dulcis Folium	Amacha (甘 茶) (K)		

a) K: killing effect.

変異原性試験

Ames の原法 [1] を改良した矢作のプレインキュベーション法 [20] に従って行った. 使用した菌株は *Salmonella typhimurium* TA100 および TA98 の両菌株で, 代謝活性化のための S-9 は PCB 誘導ラット肝を

Ames の方法〔1〕に従って作成したものを使用した。
 変異原性試験の判定は試験菌株の自然誘発突然変異コロニー数の2倍以上の復帰突然変異コロニーを誘発し、かつ濃度依存性を示したものを陽性とした。

試料の亜硝酸処理

メタノール抽出物の DMSO 可溶検体に 60mM の亜

Table 2. Positive crude drugs for mutagenesis in Ames test

Crude drug	mg	TA100		TA98	
		S-9mix -	S-9mix +	S-9mix -	S-9mix +
Hakusenhi (白鮮皮)	10	101	164	24	59
	25	95	316	28	132
	50	210	335	32	193
Kuboku (苦木)	10	93	162	25	55
	25	100	240	27	90
	50	96	444	20	127
Ryuutan (龍胆)	10	100	186	21	52
	25	86	470	17	91
	50	123	390	57	50
Sanzukon (山豆根)	25	110	106	16	37
	50	97	202	35	77
	100	200	202	10	47
Booi (防已)	25	136	450	90	100
	50	100	400	46	153
	75	156	1000	105	197
Sennayo (センナ葉)	5	95	230	25	173
	10	80	216	56	225
	25	k ^{a)}	240	130	155
Kamitsure (カミツレ)	2	76	79	27	26
	10	k	160	k	76
	25	k	200	k	91
Rengyo (連翹)	25	95	211	21	76
	50	97	252	40	111
	100	200	331	k	100
Sansho (山椒)	25	92	146	64	106
	50	87	184	95	194
	100	154	240	60	190
Hakunanten (白南天)	25	99	220	25	43
	50	102	230	24	27
	100	90	190	k	48
Tooyaku (当薬)	2	91	310	24	36
	10	52	252	32	53
	30	40	460	23	135
Otogiriso (弟切草)	25	96	210	31	210
	50	90	265	123	333
	100	54	270	20	612
Kaininso (海人草)	50	105	196	24	140
	100	50	280	15	380
	150	51	302	15	480
Benzo(a)pyrene	10 μ g		980		1100
AF-2	0.05 μ g			490	
	0.02 μ g	750			
None		85	90	17	35

a) k: killing effect.

硝酸ナトリウムを含む酢酸緩衝液 (pH3.23) 1 ml を加えて、37°C で 60 分間反応させた後、60mM スルファミン酸アンモニウム 1 ml を加えて反応を停止させた後の反応液について変異原性テストをおこなった。

実験結果

1. 生薬のメタノール抽出物の変異原性について

生薬76種のメタノール抽出物について Ames テストをおこなった結果、13種類が陽性を示した (Table 2)。それらはいずれも TA100 および TA98 に対して S-9 mix プラスで陽性であった。

陽性を示した生薬のうち TA100 の S-9 mix プラスで変異活性の高かったのは、龍胆、防己、当薬、白鮮皮、苦木であった。また、TA98 の S-9 mix プラスの変異活性の高かったのは、弟切草、センナ葉であった。

Ames テストに供した検体量 (原材料 50mg) でサルモネラ菌に対して抗菌作用を示した検体は 29 種であった (Table 1)、とくに、う金、丁字が強い抗菌作用を示した。

2. 生薬の亜硝酸処理後の変異原性について

メタノール抽出物に変異原性を示さないが、それを亜硝酸処理すると変異原性を示すように変化したものは 12 種類であった (Table 3)。

亜硝酸処理後の変異原活性は、ほとんどが TA100 および TA98 のいずれの菌株に対しても、代謝活性化を必要としないで、すなわち、S-9 mix マイナスで陽性を

Table 3. Positive crude drugs for mutagenicity by nitrite treatment

Crude drug	mg	TA100		TA98	
		S-9mix -	S-9mix +	S-9mix -	S-9mix +
Senboku (薜木)	25	272	256	210	110
Chikusetsuninjin (竹節人參)	25	265	108	117	57
Daio (大黃)	25	226	243	215	64
Gajutsu (我朮)	25	615	241	101	52
Oogon (黄芩)	22	107	100	186	10
Saiko (柴胡)	25	356	156	140	112
Tooki (当帰)	22	195	145	70	47
Saishin (細辛)	1	262	100	112	10
Chotooko (釣藤鈎)	25	194	91	188	53
Sanshishi (山梔子)	25	197	136	60	34
Kijitsu (枳実)	10	283	100	117	45
Goshuyu (呉茱萸)	25	56	75	241	50
Control		95	104	17	35

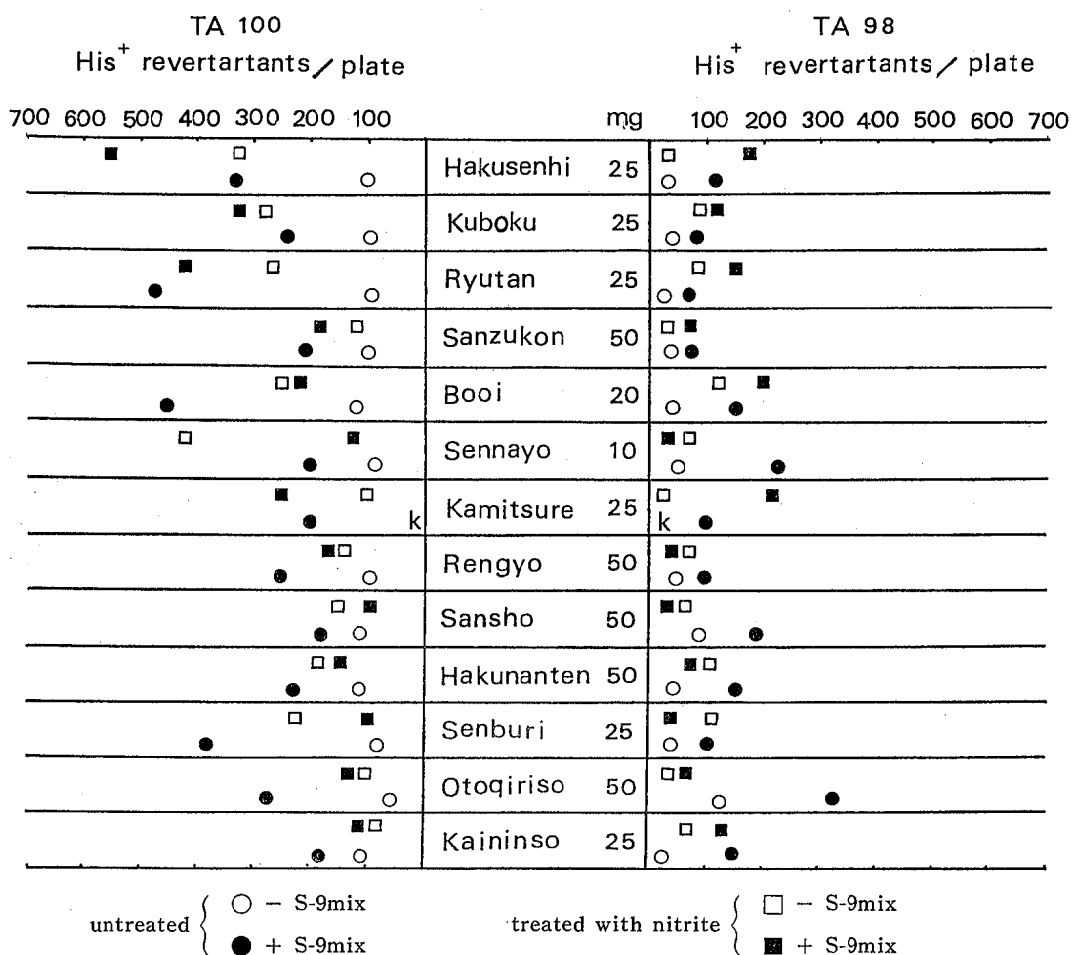


Fig. 1. Changes of the mutagenic activities by nitrite treatment.

示した。12種類の中でTA100, S-9 mix マイナスでも活性が高かったのは我述であった。その他、蘇木、大黃、柴胡、枳実、竹節人參、細辛は自然誘発突然変異コロニー数の2~3倍の復帰コロニー数であった。TA98では蘇木、大黃、黄芩、釣藤鈎、呉朱萸が高い活性を示した。

変異原陽性であったメタノール抽出物を亜硝酸処理した後の活性の変化をFig. 1に示した。亜硝酸処理後に活性が著しく低下したものは、防己、当薬(センブリ)、センナ葉、弟切草であった。逆に亜硝酸処理後にS-9 mix マイナスで変異原活性を示すようになったものは、白鮮皮、苦木、龍胆、当薬、センナ葉であった。

3. 弟切草と白鮮皮の変異原物質について

陽性を示した13種類の生薬のうち、弟切草と白鮮皮に

ついて変異原物質の検索をおこなった。

メタノール抽出物をSephadex LH 20カラム(φ2.7×39cm)を用いて、メタノールを溶出液として分画し、変異原性を示す分画をプールした。弟切草はメタノールで溶出すると、留出液360ml後に変異原性を示す分画が250mlとれたので、それを濃縮して、薄層クロマトグラフィーを用いて、2種類の溶媒(A:酢酸:水=60:40, アビセルプレート, B:ベンゼン:酢酸:水=41.7:26:1, メルク Art 5715プレート)で検討した結果、Rf 値より flavonols の quercetin と kaempferol が含まれており、変異原活性はこれらの変異原物質 flavonols によるものと推定された。

白鮮皮も弟切草と同じ条件のカラムを用いて溶出すると、留出液500ml後に変異原性を示す分画が150ml得られ

た。これを濃縮後、シリカゲルカラム($\phi 4.7 \times 14 \text{cm}$)を用いて、溶媒(シクロヘキサン:酢酸エチル=3:2)で分画すると、2つの変異原性を示すピークが得られた。これをそれぞれ分取用 TLC で溶媒 C (クロロホルム:アセトン=20:1)、溶媒 D (シクロヘキサン:酢酸エチル=1:1) を使用して分離精製をおこない、得られた物質をさらに、エチルエーテル、ヘキサンを使用して再結晶をくり返して、2つの結晶物質を得た。これらは IR, UV, $^1\text{H-NMR}$, EI-Mass スペクトラムによって、フロキノリン類アルカロイドである dictamnine と γ -fagarine と同定された。これら 2 つの変異原活性は Fig. 2 のごとくで、dictamnine は μg 当り約 60 コの復帰コロニー数であり、 γ -fagarine は μg 当り約 30~50 コの復帰コロニー数であった (Fig. 2)。

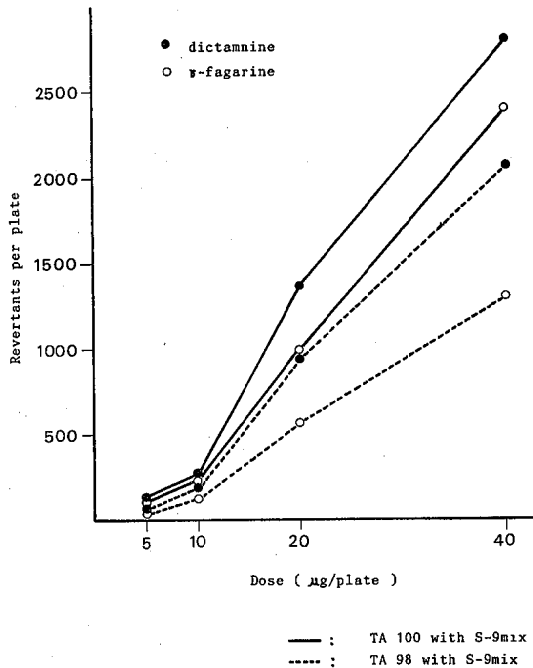


Fig. 2. Dose-effect curves of dictamnine and γ -fagarine.

考 察

76種の生薬について、メタノール抽出物の変異原性と亜硝酸処理後の変異原性について活性の変化を検討した。

メタノール抽出物が変異原性陽性であったものは13種類で、いずれも陽性発現には代謝活性化のための S-9 mix を必要とした。その中で、龍胆と当薬(センブリ)

の変異原物質はキサントン誘導体であることはすでに報告されている [5, 6, 9]。

今回白鮮皮と弟切草の変異原物質を同定したところ、弟切草の変異原物質は既知変異原物質であり、植物中の変異原物質として有名な flavonols の quercetin と kaempferol であった。

白鮮皮の変異原物質はフロキノリン類アルカロイドの dictamnine と γ -fagarine であった。

dictamnine の変異原性について Ashwood-Smith ら [2] が *Escherichia coli* に対してフレームソフトタイプの変異原性を示すことを報告しているが、Ames テストのサルモネラ菌に対する報告は現在までに報告されていない。

単離された植物成分の変異原性については、フラボノイド [11]、キサントン誘導体 [6, 10]、アントラキノン誘導体 [3, 8, 16]、ベンゾキノロンおよびナフトキノロン類 [17]、ピロリジンアルカロイド [19, 22] に関する報告があるが、dictamnine と γ -fagarine の μg 当りの復帰コロニー数はかなり高い活性の方に入る。

また、今回調査した76種の中で陰性を示したものに、上記の変異原性の報告されている植物成分が含まれていると想定されながら、変異原性を示さなかったものもあるが、この理由として考えられることは、含有量の問題や、含有される成分間の相互作用により、活性の抑制もありうることや、生薬成分中にサルモネラ菌に対する抗菌作用を示す物質も多く、細菌を用いるアッセイに不利であるものも多いこと等が考えられる。

メタノール抽出物を亜硝酸処理すると、変異原性陽性を示すような活性の変化を示したものが12種類あったが、いずれも S-9 mix マイナスで変異原性を示すことが特徴的であった。

多くのフェノール化合物は亜硝酸と反応してニトロソ化合物を生成することは知られている [12]。生薬中にはフェノール化合物が多種類含まれていることから、これらが亜硝酸と反応して変異原性のあるニトロソ化合物を生成している可能性が考えられる。センブリは亜硝酸処理後 S-9 mix マイナスで変異原性を示すが、この原因は、センブリ中のアマロゲンチンとアマロスエリンが変異原物質の前駆物質であったこと等興味ある知見が得られている [7]。

今回の検体の中で亜硝酸処理後にのみ高い変異原活性を示した我述については、亜硝酸と反応する成分について現在検討を続けている。

生薬の変異原性を検討する際に配慮しなければならないことは、天然物の成分は配糖体の形で含まれているも

の多いために、配糖体の形では変異原性を示さないにもかかわらず、配糖体が切れて、アグリコンになった場合に変異原性を示すようになる可能性の高い点である。このような過程は、人間の消化管、とくに大腸等を經由することによっておこり、細菌等の酵素によって配糖体が切れて変異原性を示す物質が遊離する可能性が示唆されている〔15, 18〕。これらを考慮した条件での検討も重要であると考えられる。

ま と め

1) 生薬76種のメタノール抽出物の突然変異原性をAmesテストでスクリーニングした結果、13種類が*Salmonella* TA100およびTA98に対してS-9 mixプラスで陽性を示した。その中で弟切草の変異原物質はflavonolsのquercetinとkaempferolであった。白鮮皮の変異原物質はフロキノリン類アルカロイドのdictamnineと γ -fagarineであった。

2) メタノール抽出物を亜硝酸処理すると、あらたに12種類が変異原性を示したが、それらはTA100およびTA98に対してS-9 mixマイナスで陽性であった。とくに我述の亜硝酸処理後の活性が高かった。

3) 変異原性陽性を示した13種類のメタノール抽出物も亜硝酸処理後、活性の著しい低下を示したものが6種類あり、またS-9 mixマイナスで陽性を示すように活性の変化のみられたものが7種類あった。

おわりに、終始、御助言、御指導をいただいた当研究所の海佐裕幸所長に深く感謝致します。また白鮮皮の変異原物質の同定に関しては当研究所金森久幸研究員に多大な協力をいただいた。併せて感謝の意を表します。

本論文の要旨は、日本環境変異原学会、第12回大会(1983年10月、徳島市)において発表した。

文 献

[1] Ames, N.B., J. McCann and E. Yamazaki (1975): Methods for detection carcinogens and mutagens with the *Salmonella*/mammalian-microsome mutagenicity test. *Mutation Res.*, 31, 347—363.

[2] Ashwood-Smith, M. J., G. H. N. Towers, Z. Abramowski, G. A. Poulton and M. Liu (1982): Photobiological studies with dictamnine, a furquinoline alkaloid. *Mutation Res.*, 102, 401—

412.

[3] Brown, J.P. and P.S. Dietrich (1979): Mutagenicity of anthraquinone and benzanthrone derivatives in the *Salmonella*/microsome test: Activation of anthraquinone glycosides enzymic extracts of rat cecal bacteria. *Mutation Res.*, 66, 9—24.

[4] Brown, J.P. (1980): A review of the genetic effects of naturally occurring flavonoids, anthraquinones and related compounds. *Mutation Res.*, 75, 243—277.

[5] 石館守三編 (1979): 生活環境と発がん, p. 1—92, 朝倉書店, 東京.

[6] Kanamori, H., I. Sakamoto, M. Mizuta, K. Hashimoto and O. Tanaka (1984): Studies on the mutagenicity of *Swertiae Herba*. 1. Identification of the mutagenic components. *Chem. Pharm. Bull.*, 32, 2290—2295.

[7] 金森久幸, 水田満里, 坂本征則, 田中 治(1984): センブリの変異原物質—第5回天然薬物の開発と応用シンポジウム—, 要旨集 p. 43—45.

[8] Liberman, D. F., R. C. Fink, F. L. Schaefer, R. J. Mulcahy and A. Stark (1982): Mutagenicity of anthraquinone and hydroxylated anthraquinones in the Ames/*Salmonella* microsome system. *Appl. Environ. Microbiol.*, 43, 1354—1359.

[9] Morimoto, I., F. Watanabe, T. Osawa and T. Okitsu (1982): Mutagenicity screening of crude drugs with *Bacillus subtilis* rec-assay and *Salmonella*/microsome reversion assay. *Mutation Res.*, 97, 81—102.

[10] Morimoto, I., T. Nozaka, F. Watanabe, M. Ishino, Y. Hirose and T. Okitsu (1983): Mutagenic activities of gentisin and isogentisin from *Gentiana radix* (Gentianaceae). *Mutation Res.*, 116, 103—117.

[11] Nagao, M., N. Morita, T. Yahagi, M. Shimizu, M. Kuroyanagi, M. Fukuoka, K. Yoshihira, S. Natori, T. Fujino and T. Sugimura (1981): Mutagenicities of 61 flavonoids and 11 related compounds. *Environ. Mutagenesis*, 31, 401—419.

[12] 並木満夫, 松下雪郎(1981): 食品成分の相互作用. p. 291—293, 講談社サイエンティフィック, 東京.

- [13] 岡部昭二 (1957) : 野菜および食品中の硝酸塩をめぐって. 化学と生物, 15, 352—359.
- [14] 小田嶋成和 (1974) : N-ニトロソ化合物による発がん研究の進歩. 食衛誌, 15, 419—433.
- [15] Tamura, G., G. Gold, A. Ferro-Luzzi and B.N. Ames (1980) : Fecalase, a model for activation of dietary glycosides to mutagens by intestinal flora. Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.), 77, 4961—4965.
- [16] Tikkanen, L., T. Matsushima and S. Natori (1983) : Mutagenicity of anthraquinones in the Salmonella preincubation test. Mutation Res., 116, 103—117.
- [17] Tikkanen, L., T. Matsushima, S. Natori and K. Yoshihira (1983) : Mutagenicity of natural naphthoquinones and benzoquinones in the Salmonella/microsome test. Mutation Res., 124, 25—34.
- [18] Uyeta, M., S. Taue and M. Mazaki (1981) : Mutagenicity of hydrolysates of tea infusion. Mutation Res., 88, 233—240.
- [19] Wehner, F.C., P.G. Thiel and S.J. Van Rensburg (1979) : Mutagenicity of alkaloids in the Salmonella/microsome system. Mutation Res., 66, 187—190.
- [20] 矢作多貴江 (1975) : 環境中の発ガン物質を微生物を使ってスクリーニングする実験法について. 蛋白質・核酸・酵素, 20 : 1178—1189.
- [21] 山本久子, 水谷民雄, 野村治子 (1982) : 生薬の突然変異誘発性に関する研究 (第1報). 薬学雑誌, 102 : 596—601.
- [22] Yamanaka, H., M. Nagao and T. Sugimura (1979) : Mutagenicity of pyrrolizidine alkaloids in the Salmonella/mammalian-microsome test. Mutation Res., 68, 211—216.

広島県下の某小学校で発生した *Campylobacter jejuni* による集団食中毒事例

佐々木 実己子* 岸 本 敬 之* 得 能 弘 志*
小 川 博 美* 福 田 伸 治*

A Waterborne Outbreak of *Campylobacter* Infection Occurring at an Elementary School

MIKIKO SASAKI, TAKASHI KISHIMOTO, HIROSHI TOKUNO,
HIROMI OGAWA AND SHINJI FUKUDA

(Received Oct. 18, 1984)

An outbreak of *Campylobacter* enteritis was recognized at an elementary school in Hiroshima in June 1982. Sixty-two of 129 children and teachers became ill. The major symptoms were abdominal pain (87.1%), diarrhea (71.0%), fever (30.6%), and vomiting (4.8%). *Campylobacter jejuni* was isolated from 26 fecal samples of 28 patients and 2 of 2 asymptomatic food handlers. Specific agglutinin with titers of 1:80 or higher (max. 1:640) was detected in 85% of convalescent sera. This is the first documented outbreak due to *Campylobacter* in Hiroshima Prefecture, and potable well water was recognized as a vehicle. *Campylobacter* was isolated from well water, river water, and feces of domestic animals.

Key words: *Campylobacter* infection, Waterborne outbreak.

緒 言

Campylobacter jejuni は獣医領域では、ウンやヒツジの流産や胎盤炎の原因菌として重視され、以前 *Vibrio fetus* と言われていた細菌であるが、生理学的、生化学的性状および遺伝学的に *Vibrio* 属とは異っていることから、現在の分類では *Campylobacter* に編入されている。

一方、ヒトの感染症としては、古くより敗血症 [1—3]、関節炎 [4—7]、髄膜炎 [8, 9]、流産 [10] などの原因となることが知られていたが、近年ではヒトの下痢症からの分離報告が散発例 [1, 11—27]、集団例 [28—41] を問わず数多くの研究者によりなされ、ヒト下痢症

の原因菌として極めて重要な位置を占めるに至った。

ところで我国においては、1980年吉崎ら [42] により最初の分離報告がされ、同年、伊藤ら [43] の東京都内の保育園で発生した集団発生例についての詳細な報告に端を発し、以来、*Campylobacter* の検索が全国的に実施されるようになり、散発下痢症の原因菌として、また食中毒の原因菌として、*Salmonella* や腸炎ジブリオをしのぐ頻度でしばしば分離されることが確認された [44—73]。このことから、昭和57年3月11日厚生省は環食第59号により、本菌を新しく食中毒菌の一つに指定した。

我国での集団発生例については、伊藤らの報告以来多くの報告がみられる [53—74]。しかしその原因食品、感

* 広島県衛生研究所：Hiroshima Prefectural Institute of Public Health.

染源となると、未だ究明された事例は少なく〔54, 72, 74〕、*Campylobacter* 症の疫学を知るためには、さらに多くの症例における詳細なデータの蓄積が待たれているところである。

我々は1982年6月12日から22日にかけて、広島県北部の小さな小学校で発生した食中毒事件について調査した結果、患者糞便および使用水である井戸水より *Campylobacter jejuni* を分離し、さらに患者血清にその抗体の確認を行った。本事例は広島県下で初めて確認された *Campylobacter* による集団発生例であるとともに、感染源が井戸水であることを究明しえた貴重な1事例と思われるので、その発生状況と細菌学的検査結果の詳細について報告する。

材料および方法

発生状況や臨床症状などはアンケートおよび聞き取り調査による。

細菌学的検査材料：発病初期（6月15日採取）の患者糞便28件、調理従事者糞便2件、検食（6月10, 11日および14日の給食）8件、調理器具および手指ふきとり13件、井戸水1件の計52件について食中毒原因菌検索を開始した。後日の保菌調査や疫学調査では、7月6日児童糞便17件、教員糞便13件、調理従事者糞便2件および児童の家族糞便5件、7月8日調理従事者糞便2件、井戸水1件、河川水1件、7月13日調理従事者糞便2件、7月21日児童糞便1件、8月9日井戸水1件、河川水1件、ウン糞便19件、ブタ糞便7件の計72件をそれぞれ採取し、*Campylobacter* の分離を試みた。

食中毒原因菌検索：*Salmonella*, *Vibrio parahaemoly-*

ticus, Enteropathogenic *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens*, *Bacillus cereus*, Non-O1 *Vibrio cholerae*, *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas sobria*, *Plesiomonas shigelloides*, *Yersinia enterocolitica*, *Vibrio fluvialis*, *Campylobacter jejuni* および *Campylobacter coli* を対象として、常法どおり食品衛生検査指針 I および環食第59号の方法に準拠し実施した。なお、今回の原因菌である *Campylobacter* に関する具体的実施方法はつぎのとおりである。

Campylobacter の分離・同定：分離培地は Skirrow の培地 (GIBCO 製 Blood Agar Base に7%馬血液と OXOID 製 Skirrow のサプリメントを加えて調製) を使用し、OXOID 製 *Campylobacter* 用ガス発生キットを用いて好気条件下で 42°C 48 時間培養を行った。水については 2 ℓ を 0.45 μ のメンブラフィルターで濾過した後、フィルターを Skirrow 培地 3 枚にスタンプし、以下同様の条件で分離を試みた。また、ウンとブタの糞便からの分離培養には Skirrow 培地に amphotericin B (2 mg/ℓ) を抗カビ剤として添加し使用した。

発生した colony について吉崎ら〔75〕、伊藤ら〔76〕の方法に従い、形態学的観察、生化学的性状検査を行い同定した。

患者血中抗体価測定：代表分離株 (Konan 5) のホルマリン処理抗原を使用し、伊藤ら〔53〕の記載に従い、試験管内定量凝集反応で測定した。

成 績

1. 発生状況

1982年6月12日から22日にかけて広島県北部の山間に

Table 1. *Campylobacter* enteritis attack rate among pupils and staff members of an elementary school

Subject	Number of persons at risk	Number of patients (Attack rate, %)
Pupils		
1st grade	17	10 (58.8)
2nd grade	28	17 (45.0)
3rd grade	18	10 (55.6)
4th grade	16	4 (25.0)
5th grade	22	15 (68.2)
6th grade	13	5 (38.5)
Staff members	15	1 (6.7)
Total	129	62 (48.1)

ある小さな小学校において、学校関係者 129名中児童61名および教育実習生 1名計62名の患者発生をみ、発症率は48.1%であった。発症児童について、クラス別に発症率を比較した結果、表1に示すごとく、25.0~68.2%とかなりの変動あるものの、すべてのクラスに患者発生が認められ、全校児童に共通する原因が考えられた。なお教職員の発症率は児童に比較して低く6.7%であった。

患者の発生は図1に示すごとく、12日の初発、14日のピークののち、15日以降は漸減したが22日まで続き11日間にわたって認められた。

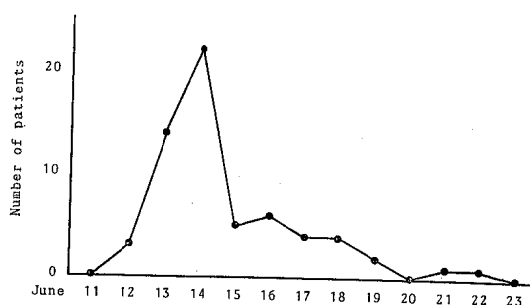


Fig. 1. Distribution of date of onset of the illness.

次ぎに、日別発生状況を学年別にみると、表2に示した如く、各学年とも14日をピークとして発症しており、学年による差は認められなかった。さらに患者の地域別分布について(図2)みると、患者が集合している場所は、地形的に、山間を流れる川にそって集落が点在している場所と一致し、集落による偏在性は認められなかった。また、同町の一般の住民や中学校生徒、保育所の幼

児などからの発生は認められなかったことから、この小学校内において、同一条件のもとで感染を受けたことが考えられ、学校給食などによる単一曝露が推察された。ところで給食については、この小学校だけで給食を実施しており、事件発生日およびその前日にかけての献立は、6月10日木曜日:スパゲティサラダ、若どりオーロラ煮、飯、つけもの、牛乳、11日金曜日:チーズサンドフライ、トマト、五目ひじき、飯、牛乳であった。また14日月曜日はかき玉汁、アジの南蛮づけ、わかめめし、牛乳の献立であったが、摂食状況調査では、いずれの献立についても喫食率が非常に高く、 χ^2 値は求められなかった。各献立ごとの喫食者の発症率は41.7~49.2%を示し、特徴ある傾向は認められなかった。

一方、学校の給水については、裏山の湧出水を貯水し、近くに位置する町立研修センター、保育所とこの小学校の3施設に給水されていた。ところが夏場の渇水により水量が減少し、またプールの使用開始にあたり、小学校は独自に多量の水量を確保するため、事件発生より2日前の6月10日の夕方から、新たな水源として川の近くの井戸から直接採水し、給水をはじめており、患者発生との時間的關係からも関連性が高いと考えられた。

患者の主要症状は、表3に示したように腹痛(87.1%)、下痢(71.0%)、発熱(30.6%)であり、下痢は全員水様便であった。発熱の認められた19名のうち10名が38.0~39.0°Cで39°C以上は4名であった。嘔吐は4.8%に認められた。

2. 細菌学的検査結果

Campylobacter の分離状況:表4および5に取りまとめたごとく、急性期の患者から92.9%、症状を認めな

Table 2. Reported cases of *Campylobacter* enteritis by date of onset

Subject	Number of patients													
	June	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23
Pupils														
1st grade			1	2	4		3							
2nd grade				4	7	3		1				1		
3rd grade			1	1	2	1	2	1	1	2			1	
4th grade				1					3					
5th grade				4	8		1	2						
6th grade				2	1	1		1						
Staff members			1											
Total		0	3	14	22	5	6	4	4	2	0	1	1	0

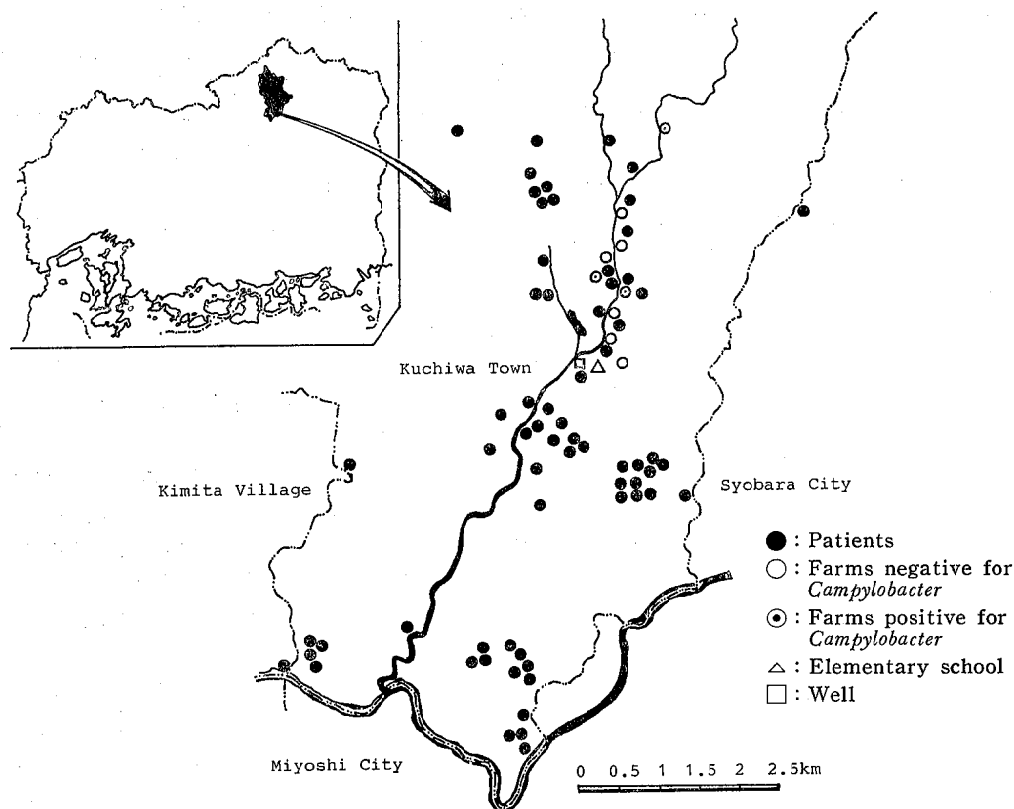


Fig. 2. Geographical distribution of patients and farms.

Table 3. Major symptoms of patients

Symptom	Number of patients (%)	
Abdominal pain	54	(87.1)
Diarrhea	44	(71.0)
2 times or less	11	
3-4 times	5	
5-6 times	4	
7 times or more	0	
Unknown	24	
Fever	19	(30.6)
37.0-37.9°C	4	
38.0-38.9°C	10	
39.0°C or higher	4	
Unknown	1	
Vomiting	3	(4.8)

った調理従事者から100%の検出をみた。Campylobacter 以外の食中毒起因菌としては *Salmonella paratyphi B d-tartrate** が1名から分離されたのみであった。

そして疫学的調査材料については事件発生時の検食(10, 11, 14日の給食)および調理場の施設, 器具ふきとり, 手指ふきとりからは菌は分離されず, 6月10日より使用を始めた水源である井戸水から *Campylobacter* の検出をみた。また, 後日の井戸水汚染源究明のための調査(3週間後, 8週間後)においても井戸水からは連続して菌の分離をみた。さらに井戸の附近を流れている河川水からも分離をみた。次いでその川にそって上流に点在する和牛育成農家や養豚場で飼育されている家畜について調査を行った。その結果, ウシ糞便19件中1件, ブタ糞便7件中3件からそれぞれ *Campylobacter* の分離をみた。

なお, 学校関係者および児童の家族について後日(3週間後)保菌状況調査を行ったが, 検出率は調理従事者100%, 児童23.5%, 教員15.4%, 児童の家族0%であった。

さらに教育委員会から給食を開始するに先だって調理従事者より菌分離を見なくなるまでの追跡を依頼され行

Table 4. Results of bacteriological examination of fecal specimens

Date	Subject	No. examined	No. positive for <i>Campylobacter</i> (%)
June 15	Patients	28	26 (92.9)
	Food handlers	2	(100)
July 6	Pupils	17	(23.5)
	Teachers	13	(15.4)
	Food handlers	2	(100)
	Family members of a pupil	5	(0)
	Food handlers	2	(100)
July 8	Food handlers	2	(0)
July 13	Food handlers	2	(0)
July 21	Pupil	1	(0)

Table 5. Results of bacteriological examination for incriminated source and route

Date	Subject	No. examined	No. positive for <i>Campylobacter</i> (%)
June 15	Food samples	8	0 (0)
	Swabs of cooking tools	13	0 (0)
	Well water	1	1 (100)
July 8	Well water	1	1 (100)
	River water	1	1 (100)
August 9	Well water	1	1 (100)
	River water	1	1 (100)
	Feces of cows	19	1 (5.3)
	Feces of pigs	7	3 (42.9)

Table 6. Serum agglutinin titers of patients and food handlers against *Campylobacter jejuni*

Subject	No. of sera examined	No. of sera with titers of					
		<40	×40	×80	×160	×320	×640
Pupils							
1st grade	3		1		1		1
2nd grade	9		1	1	4	2	1
3rd grade	4		1		1	1	1
5th grade	8				1	4	3
Food handlers	2		1		1		
Total	26		4	1	8	7	6

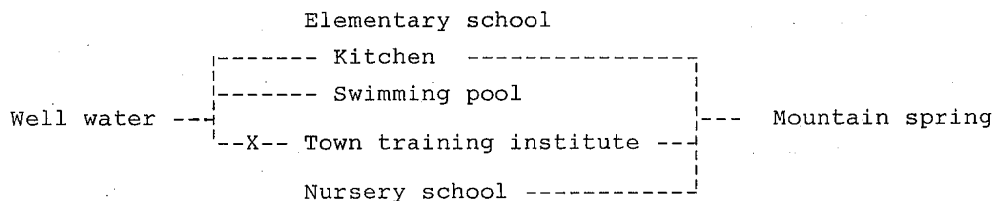


Fig. 3. Water supply system.

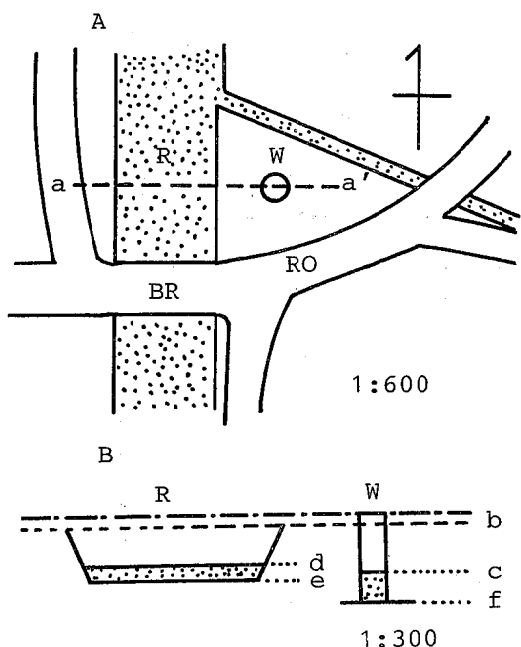


Fig. 4. Location of the well for potable water.

A: plan view, B: cross-sectional view through a-a', R: river, W: well, BR: bridge, RO: road, b: ground level, c: water level of well, d: water level of river, e: bottom of river, f: bottom of well.

った結果は、4週目では検出されたが、5週間後において菌の分離をみなくなった。

分離菌株の性状：分離株の性状は、グラム陰性のらせん状に弯曲した小桿菌で、コルクスクリュー様の運動がみられた。好氣的発育(-)、オキシダーゼ(+),カタラーゼ(+),CTA培地でのブドウ糖分解(-),各種温度による発育試験：25°C(-),37°C(+),43°C(+),硝酸塩還元(+),H₂S産生性はT S I培地(-),cystine加プルセラ半流動培地での酢酸鉛糖紙法で(+),glycine加プルセラ半流動培地での発育(+);であり、*Campylobacter jejuni/coli*に一致した。

馬尿酸分解試験は、ヒト由来株および15日に分離した井戸水由来株は(+)であったが、事件発生4週間および8週間後に分離した水由来株はいずれも(-)であった。ウン由来株は(+),ブタ由来株はいずれも(-)であった。また、ナリジキシン酸、エリスロマイシンに対する感受性テストではいずれの菌株も感受性であった。

患者血中抗体価：急性期の血清は入手できなかったが、4週間後に協力の得られた26名について抗体価測定を行った結果を表6に示した。80倍以上の抗体価を示した者が85%を占め、明らかに*Campylobacter*による感染のあったことが推察された。40倍を示した3名については学校の健康観察記録を調査したところ、1名は事件より2~3日前に風邪がみなどで医師の診察を受けていたり、他は他の病名で以前より通院しており、事件時のアンケート調査では有症者となっているが、全く欠席していないことから、比較的軽い症状で経過したものか、あるいは無症者とすべき者であったと考えられる。また非発症者で菌検出をみた2名の調理従事者は、1名は160倍を示し、他は40倍であった。

考 察

Campylobacter jejuni は比較的最近までヒト下痢症の原因菌としては見のがされていた細菌であった。最初下痢症の原因菌として指摘したのは King [1] の下痢を伴う敗血症患者血液から分離される *Vibrio* 様細菌について詳細に述べた報告であり、下痢症の原因菌として下痢便からの分離に成功したのは、獣医領域で応用されているメンブラン濾過の方法を人医領域に応用した Dekeyser ら [12], Butzler ら [13, 14] であった。そして1977年, Skirrow [15] は抗生物質を加えた分離培地を考案し、散発下痢症からの分離に応用したところ7.1%に *Campylobacter* を認めたと報告した。この検査法の普及により、世界各国で盛んに調査されるようになり、下痢症の原因菌としての重要性が認識されるに至った。我国においても、1980年吉崎ら [42] は散発下痢患者より分離し、その発生頻度の高さに注目し、重要性を

強調した。

一方、集団発生例の報告は1938年5月米国イリノイ州で発生した生のミルクが原因と推定された事例において重症患者の血液から *Vibrio jejuni* が検出され、下痢便の鏡検で *Vibrio* 様細菌を多数認めた Levy (1946)[28] の報告が最初と思われる。牛乳が原因と考えられる事例としては米国の Taylor, 英国の Robinson ら, Porter ら, Wallace, Jones, P.H. ら, Jones ら, Robinson ら, カナダの McNaughton らの報告がみられ [30—37], 水系感染と考えられる事例は Vogt [29] の 1978 年米国バーモント州で発生した事例や, Mentizing の スエーデンの事例がみられる。また、肉からの感染では鶏肉からの Brower ら, Skirrow ら, Itoh ら, Mouton らの報告 [39—40, 77—78] が、牛肉のハンバーガーによる事例の Oosterom ら [41] の報告がみられる。

日本では伊藤ら (1980)[53, 43] が1979年1月東京都下の保育園で発生した事例について詳細に報告したのが最初であり、その後、海沼ら (1979, 東京都) [54], 豊川ら (1980, 青森県)[55], 滝沢ら (1980, 神奈川県) [56], 藤野ら (1980, 岩手県) [57], 松崎ら (1980, 1981, 山口県) [58, 59], 池村ら (1981, 新潟県) [60], 村上ら (1981, 静岡県) [61], 芹川ら (1981, 石川県) [62], 白石ら (1981, 札幌市) [63], 石井ら (1981, 高知県) [64], 小河ら (1981, 大分県) [65], 岡部ら (1982, 栃木県) [66], 水野ら (1983, 栃木県) [71], 大谷ら (1982, 1983, 和歌山県) [67, 73], 森田ら (1982, 秋田県) [68], 武藤ら (1982, 横浜市) [69], 小岩井ら (1982, 千葉県) [70], 谷川ら (1983, 宮崎県) [72] の諸報告がみられ、今では我国においても集団下痢症特に集団食中毒事件における重要な原因菌として認識されている。また、病原微生物検出情報 (月報) に集団発生例の項目が記載されるようになった1982年1月から1984年7月までの55カ月間に、*Campylobacter* が原因と報告された事例は67例を数え、年間発生件数は24~29件となり、*Campylobacter* による集団発生の頻度はかなり高く、多くの事例について詳細な調査がなされている。

しかしながら、集団発生例における感染源、感染経路の究明については不明となる事例が多く、原因が明記されている事例においても疫学調査結果から推定されている事例が大部分を占め、菌分離を見る形で証明された事例としては、Wallace らのミルク [33], 海沼ののアサリのぬた [54], 谷川らの鶏ササ身のたたき [72], 伊藤らの鶏肉 [74], 札幌市の井戸水^a, 大分県の給水^a, 神

奈川県の鶏肉 (ササミ) の生食^a, 新潟県の上水道^aなどがみられる程度で、原因食品が感染源、感染経路とともに証明されることは極めてまれであると言える。

我々の経験した事例は、広島県の北部の山間の稲作と和牛や豚飼育の盛んな農山村に位置する小さな小学校で発生した夏かぜを思わせる集団発生事例であった。しかし疫学調査結果よりその小学校の集団に限られていることが判明し、発病原因はこの学校だけで調理されている学校給食またはこの学校に限られた給水等が推定された。次いで、患者発生と新しく使用を開始した水源からの給水開始時期との時間的符合、そして細菌学的検査結果の裏付けから、本事例は新しく使用を開始した井戸水による水系感染と結論した。すなわち、井戸水より *Campylobacter jejuni* および *Campylobacter coli* の分離をみ、その井戸の近くを流れている川の水からも分離された。さらに川の上流に位置する和牛育成農家や養豚場で飼育されている家畜の糞便を調査したところ、川の上流1Kmに位置する和牛育成農家のウシ3頭中1頭より *Campylobacter jejuni* を、2Km上流の養豚場のブタ4頭中2頭より、3.5Km上流の養豚場のブタ4頭中1頭よりそれぞれ *Campylobacter coli* を分離した。従って、川の上流で飼育されているウシやブタの糞尿が河川を恒常的に汚染しているものと考えられ、河川と井戸との関係、井戸の構造も図3, 4に示すごとく、川と井戸の距離は5m、井戸の構造も水量確保を目的としたもので井戸水はほとんど河川水が粗濾過しただけで直接流入している状態であった。さらに給水ポンプのそばに塩素殺菌のための次亜塩素酸ナトリウム注入装置は設置されていたが、給水開始に際し適正な運転がなされていなかった。そのため井戸水は未殺菌のまま給水され、プール水、飲用水、給食調理のための使用水として利用されたために今回の事例は発生したものと考察される。

この井戸水は、10日夕方から揚水開始され、プールへの貯水がなされたが金曜日、土曜日には水泳の授業はなされていない。児童の飲用水としては、11日金曜日の登校以後から12日土曜日の昼頃までの間に利用されたもので、事件探知された14日月曜日10時以降は生水の飲用はしないように指導を徹底し、15日からは各自水筒を持参させるなどの措置が取られていたことから、飲用による曝露は11日の朝から12日の昼までの27~28時間であったと推定される。なお、給食調理用の使用水としては11日に使用されたのみである。

このことから、曝露時点を11日の9時とすると患者発

a 病原微生物検出情報 (月報) 1982年1月~1984年9月。

生のピークは69時間後に、また12日の12時とすると42時間後にみられたこととなる。

なお患者発生状況や患者の臨床症状、血中抗体価の上昇、分離株の性状等については既報の事例と比較し有意に異なる点は認められなかった。

今回の調査を経験し、そしてこれまでの報告例を参照した場合、疫学調査結果から明らかに原因食品や水などの感染源が推定される事例においても、それらからの菌分離は非常に困難であり、恒常的汚染がある場合や、微好気条件、温度条件、水分含有条件、時間的経過が短いなどの各条件が整った場合にのみ成功しうると考えられ、*Campylobacter* の疫学を知る上にはさらに綿密な調査による多くの詳細なデータの蓄積が必要と考えられる。

要 約

1982年6月12日から22日にかけて広島県下の小学校関係者129名中62名の患者発生を見た集団食中毒事例は調査の結果、学校の井戸水を原因とする水系感染と判明した。疫学調査、細菌学的検査結果は以下のように要約される。

1. 患者発生はこの小学校関係者に限り、14日をピークとし11日間にわたる一峰性の単一曝露型の感染様式を示し、潜伏期はおよそ42～69時間と推定され、感染源は井戸水であった。

2. 主要症状は腹痛(87.1%)、下痢(71.0%)、発熱(30.6%)であった。

3. *Campylobacter jejuni* が事件発生時の患者便92.9%、調理従事者便100%、井戸水100%から分離された。また、3週間後の保菌調査でも児童23.5%、教員15.4%、調理従事者100%に認められた。井戸水、河川水からは3週間後、8週間後においても検出された。川にそって上流に位置する農家で飼育されているウシ5.3%から*Campylobacter jejuni*を、ブタ42.9%から*Campylobacter coli*を分離した。

4. 感染源および経路は家畜→河川水→井戸水→給水→ヒトであることが判明した。

5. 1カ月後における26名の患者血中抗体価は80倍以上が約85%を占め、*Campylobacter jejuni*による感染が証明された。

終わりにこの調査に際し検体採取、疫学調査に御協力を頂いた庄原保健所食品衛生監視員の方々に深謝いたします。また、終始御指導および御協力を賜った東京都立衛生研究所の伊藤武博士をはじめ食中毒研究室の諸先

生に謹謝いたします。

本論文の要旨は第45回食品衛生学会(1983年5月19日、東京)において発表した。

文 献

- [1] King, E.O. (1957): Human infections with *Vibrio fetus* and a closely related *Vibrio*. J. Infect. Dis., 101: 119—128.
- [2] Mascart, G. and Gottignies, P. (1979): Enteritis and septicemia due to *Campylobacter jejuni*. Acta Clin. Belgica, 34: 365—369.
- [3] Rahman, M. (1979): Bacteraemia and pericarditis from *Campylobacter* infection. Br. J. Clin. Pract., 33: 331—334.
- [4] King, S. and Bronsky, D. (1961): *Vibrio fetus* isolated from a patient with localized septic arthritis. J. Am. Med. Assoc., 175: 1045—1048.
- [5] Weir, A., Keat, A.C., Welsby, P.D. and Brear, G. (1979): Reactive arthritis associated with *Campylobacter* infection of the bowel. J. Infect., 1: 281—284.
- [6] Berden, J.H.M., Muyltjens, H.L. and Putte, L.B.A. (1979): Reactive arthritis associated with *Campylobacter jejuni* enteritis. Br. Med. J., 1: 380—381.
- [7] Bekassy, A.N., Enell, H. and Schalen, C. (1980): Sever polyarthritits following *Campylobacter* enteritis in a 12-year-old boy. Acta Padiat. Scand., 69: 269—271.
- [8] Eden, A.E. (1961): *Vibrio fetus* meningitis in a newborn infant. J. Pediatr., 61: 33—38.
- [9] Thomas, K., Chan, K.N. and Ribeiro, C.D. (1980): *Campylobacter jejuni/coli* meningitis in a neonate. Br. Med. J., 280: 1301—1302.
- [10] Vincent R., Dumas, J. and Picard, N. (1947): Septicemie grave au cours de la grossesse, due a un vibriion Avortment consecutif. Bull. Acad. Nat. Med., 131: 90—93.
- [11] Wheeler, W.E. and Borchers, J. (1961): Vibrionic enteritis in infants Am. J. Dis. Child., 101: 86—92.
- [12] Dekeyser, P., Gossuim-Detrain, M., Butzler, J.P. and Sternon, J. (1972): Acute enteritis due

- to related *Vibrio*: first positive stoolcultures. J. Infect. Dis., 125: 390—392.
- [13] Butzler, J.P. (1973): Related vibrios in Africa. Lancet, II: 858.
- [14] Butzler, J.P., Dekeyser, P., Detrain, M. and Dehaen, F. (1973): Related vibrio in stools. J. Pediatr., 82: 493—495.
- [15] Skirrow, M.B. (1977): *Campylobacter* enteritis: a "new" disease. Br. Med. J., 2: 9—11.
- [16] Blaser, M., Cravens, J., Powers, B.W. and Wang, W.L. (1978): *Campylobacter* enteritis associated with canine infection. Lancet, II: 979—981.
- [17] De Mol, P. and Bosmans, E. (1978): *Campylobacter* enteritis in Central Africa. Lancet, I: 604.
- [18] Lauwers, S., De Boeck, M. and Butzler, J.P. (1978): *Campylobacter* enteritis in Brussels. Lancet, I: 604—605.
- [19] Steele, T.W. and Mc Dermott, S. (1978): *Campylobacter* enteritis in South Australia. Med. J. Aust., 2: 404—406.
- [20] Bengtsson, S. and Uhnö, J. (1978): Enteritis caused by *Campylobacter*. Lakartidningen, 75: 47 03—4706.
- [21] Blaser, M.J., Berkowitz, I.D., La Force, F.M., Cravens, J., Reller, L.B. and Wang, W.-L.L. (1979): *Campylobacter* enteritis: clinical and epidemiologic features. Ann. Intern. Med., 91: 179—185.
- [22] Longfield, R., O'donnell, J., Y udt, W., Lissner, C. and Burns, T. (1979): Acute colitis and bacteremia due to *Campylobacter fetus*. Digest. Dis. Sci., 24: 950—953.
- [23] Lambert, M.E., Schofield, P.E., Ironside, A.G. and Mandal, B.K. (1979): *Campylobacter* colitis. Br. Med. J., 1: 857—859.
- [24] Quinn, T.C., Corey, L., Chaffee, R.G., Schuffler, M.D. and Holmes, K.K. (1980): *Campylobacter* proctitis in a homosexual man. Ann. Int. Med., 93: 458—459.
- [25] Blaser, M.J., Parosns, R.B. and Wang, W.L. L. (1980): Acute colitis caused by *Campylobacter fetus* ss. *jejuni*. Gastroenterol., 78: 448—453.
- [26] Norkrans, G. and Svedhem, Å. (1982): Epidemiological aspects of *Campylobacter jejuni* enteritis. J. Hyg., Camb., 89: 163—170.
- [27] Blaser, M.J., Weiss, S.H. and Barrett, T.J. (1982): *Campylobacter* enteritis associated with a healthy cat. J. Am. Med. Assoc., 247: 816.
- [28] Levy, A.J. (1946): A gastroenteritis outbreak probably due to a bovine strain of *Vibrio*. Yale J. Biol. Med., 18: 243.
- [29] Vogt, R.L., Sours, H.E., Barrett, T., Feldman, R.A., Dickinson, R.J. and Witherell, L. (1982): *Campylobacter* enteritis associated with contaminated water. Ann. Inter. Med., 96: 292—296.
- [30] Taylor, P.R., Weinstein, W.M. and Bryner, J.H. (1979): *Campylobacter fetus* infection in human subjects: association with raw milk. Am. J. Med., 66: 779—783.
- [31] Robinson, D.A., Edgar, W.J., Gibson, G.L., Matchett, A.A. and Robertson, L. (1979): *Campylobacter* enteritis associated with consumption of unpasteurised milk. Br. Med. J., 1: 1171—1173.
- [32] Porter, L.A. and Reid, T.M.S. (1980): A milk borne outbreak of *Campylobacter* infection. J. Hyg., Camb., 84: 415—419.
- [33] Wallace, J.M. (1980): Milk-associated *Campylobacter* infection. Health Bull., (3): 57—61.
- [34] Jones, P.H., Willis, A.T., Robinson, D.A., Skirrow, M.B. and Josephs, D.S. (1981): *Campylobacter* enteritis associated with the consumption of free school milk. J. Hyg., Camb., 87: 155—162.
- [35] Jones, D.M., Robinson, D.A. and Eldridge, J. (1981): Serological studies in two outbreak of *Campylobacter jejuni* infection. J. Hyg. Camb., 87, 163—170.
- [36] Robinson, D.M. and Jones, D.M. (1981): Milk-borne *Campylobacter* infection. Br. Med. J., 282: 1374—1376.
- [37] Mc Naughton, R.D., Leyland, R. and Mueller, L. (1982): Outbreak of *Campylobacter* enteritis due to consumption of raw milk. Canad. Med. Assoc. J., 126: 657—658.

- [38] Mentzing, L.O. (1981): Waterborne outbreak of *Campylobacter enteritis* in central Sweden. *Lancet*, II: 352—354.
- [39] Brouwer, R., Mertens, M.J.A., Siem, H.T. and Katchaki, J. (1979): An explosive outbreak of *Campylobacter enteritis* in soldiers. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 45: 517—519.
- [40] Skirrow, M.B., Fidoe, R.G. and Jones, D.M. (1981): An outbreak of presumptive food-borne *Campylobacter enteritis*. *J. Infect.*, 3: 234.
- [41] Oosterom, J., Beckers, J.H., VanNoorle Jansen, L.M. and Van Schothorst, M. (1980): En explosie van *Campylobacter*-infectie in een Kazerne, waarschijnlijk veroorzaakt door rauwe tartaar. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 46: 1631—1634.
- [42] 吉崎悦郎, 神木照雄, 坂崎利一, 田村和満 (1980): *Campylobacter fetus* subsp. *jejuni* による下痢症について. *感染症誌*, 54: 17—21.
- [43] Itoh, T., Saito, K., Maruyama, T., Sakai, S., Ohashi, M. and Oka, A. (1980): An outbreak of acute enteritis due to *Campylobacter fetus* subspecies *jejuni* at a nursery school in Tokyo. *Microbiol. Immunol.*, 24 (5): 371—379.
- [44] 深見トシエ, 柏真知子, 岩瀬世津子, 久鍋美晴, 鴻巣晶子, 左田琢生, 吉松 彰, 村田三紗子, 今川八束, 齋藤 誠, 丸山 務, 齋藤香彦, 坂井千三(1980): 下痢症患者からの *Campylobacter fetus* subsp. *jejuni* の分離状況. *感染症誌*, 54: 56.
- [45] 十川みさ子, 香西淑行, 岡崎秀信, 鎌倉 守, 水嶋利治 (1980): 小児下痢症の病原検索について. *香川県衛研所報*, 9: 31—33.
- [46] 平塚節子, 中村 令, 福島 博, 齋藤孝一, 西野 泰生, 福岡マツ子, 益井加代子, 村上敬子 (1980): 散发性下痢患者からのキャンピロバクターの分離状況. *島根衛研所報*, 22: 114.
- [47] 小岩井健司, 郡 美夫, 駿河洋介, 三瓶憲一, 内村真佐子, 七山悠三 (1981): 下痢症患者からの *Campylobacter jejuni* の検出状況. *千葉衛研報告*, 5: 33—36.
- [48] 小野一男, 大井百合子, 島田邦夫, 井上 豊 (1981): 小児下痢患者よりの *Campylobacter jejuni* の検出. *兵庫県衛研研究報告*, 16: 35—38.
- [49] 久保一郎, 多田 博, 多田和幸 (1981): *Campylobacter jejuni* 検出頻度の調査研究. *徳島県衛研年報*, 20: 1—4.
- [50] 山崎茂一, 畑 祥子, 刑部陽宅, 石黒和正, 柳原佐喜矩, 松井琴乃, 中村京子, 橋爪淑子 (1982): 小児下痢症からの *Campylobacter jejuni/coli* の分離. *富山衛研年報*, 昭和56年度: 81—87.
- [51] 豊川安延, 大友良光, 野呂キョウ, 秋山 有 (1982): 青森県における食中毒起因菌の分布に関する調査研究 (第2報): 青森県衛研所報, 19: 15—20.
- [52] 山田三紀子, 武藤哲典, 北爪晴恵, 仲沢和巳, 鈴木正弘, 紫田幸生, 母里啓子 (1982): 横浜市における海外渡航者下痢症の細菌学的検討. *横浜衛研年報*, 21: 55—60.
- [53] 伊藤 武, 齋藤香彦, 柳川義勢, 稲葉美佐子, 甲斐明美, 丸山 務, 坂井千三, 大橋 誠, 岡 愛子, 円城寺政子, 菱沼 勉, 千種操子 (1979): 東京都内の保育園で発生した *Campylobacter fetus* subsp. *jejuni* による集団下痢症. *東京衛研年報*, 30—1: 1—6.
- [54] 海沼 勝, 山下智司, 平井政好, 和泉充夫, 坂井千三, 丸山務, 齋藤香彦 (1979): *Campylobacter fetus* subspecies *jejuni* が原因と推定される食中毒について. *食品衛生研究*, 29: 861—867.
- [55] 豊川安延, 大友良光, 野呂キョウ, 秋山有 (1980): 青森県内の中学校で発生した *Campylobacter jejuni* による集団下痢症. *青森県衛研所報*, 17: 19—21.
- [56] 滝沢金次郎, 浅井良夫, 安田哲夫, 松島章喜, 中塚 繁, 宮本 泰, 藤井信雄 (1980): 県内の小学校で発生した *Campylobacter jejuni* による集団下痢症. *神奈川県衛研研究報告*, 10: 39—41.
- [57] 藤野訓男, 金田一達男 (1980): 食中毒集団事例の調査—岩手県における *Campylobacter jejuni* による集団下痢症について. *岩手衛研年報*, 23: 45—51.
- [58] 松崎静枝, 片山 淳, 川口信行, 田中一成, 原田耕一, 重枝重郎, 大田英一郎, 吉和 鴻, 林 洋子, 田中周郎, 石丸英治, 丸田敏行, 酒井 理 (1982): 山口県で発生した *Campylobacter jejuni/coli* による食中毒について. *食衛誌*, 23(5): 393—398.
- [59] 松崎静枝, 片山 淳 (1981): *Campylobacter jejuni/coli* による食中毒. *山口県衛研年報*, 24: 26.
- [60] 池村謙吾, 篠川 至 (1981): *Campylobacter jejuni* による下痢症の集団発生例について. *感染症誌*, 55: 883—884.
- [61] 村上正博, 中津川修二, 塩沢寛治, 浅川 豊 (1981): 静岡県内の小学校並びに女子高校で発生した

- Campylobacter jejuni/coli* による集団下痢症. 静岡県衛生研報告, 24 : 29—33.
- [62] 芹川俊彦, 木村晋亮(1981) : *Campylobacter jejuni* が原因と推定される食中毒事例. 石川衛公研年報, 18 : 416—418.
- [63] 白石圭四郎, 山口 温, 吉田靖宏, 熊谷泰光, 佐藤勇次, 塚田正和, 林 英夫, 高杉信男 (1981) : カンピロバクター・ジェジュニ菌による集団下痢症について. 札幌市衛研年報, 9 : 41—43.
- [64] 石井隆夫, 野島敏弘, 稲本文男, 上田雅彦(1981) : *Campylobacter jejuni* を原因とする食中毒事例について. 高知衛研所報, 28 : 94—97.
- [65] 小河正雄, 緒方喜久代, 森下晶勲, 朝来義雄 (1981) : キャンピロバクター・ジェジュニによる集団下痢症例の細菌学的検査について. 大分県公害衛生センター年報, 9 : 35—37.
- [66] 岡部正道, 山本いつ子, 渡辺清志 (1982) : *Campylobacter jejuni* による散発下痢症および1集団発生例ならびに患者の血中抗体価に関する研究. 衛生検査, 31 : 48—53.
- [67] 大谷 寛, 井藤典彦, 楠山和弘, 神木照雄, 石垣彰一, 青木 洋, 佐藤博之, 愛州隆一郎, 坂上昇平, 塩地隆英, 小坂和生, 大江常義, 前田寿子, 北島淳二郎, 伊東慎介 (1982) : 和歌山県内で発生した食中毒集団事例—給食が原因と考えられた *Campylobacter jejuni/coli* による食中毒について—. 和歌山県衛研年報, 28 : 41—51.
- [68] 森田盛大, 山脇徳美, 斎藤志保子, 庄司キク, 藤井十二郎, 大野悦朗, 藤原克三, 天野保二 (1982) : 県内に発生した *C. jejuni* による集団下痢症 (第1報). 秋田県衛科研所報, 26 : 51—56.
- [69] 武藤哲典, 山田三紀子, 北爪晴恵, 鈴木正弘, 紫田幸生, 母里啓子, 有川幸治, 水野惇雄, 福村俊之, 皆川大同, 矢野栄三, 松尾宗芳, 溝口千里, 落合博 (1982) : *Campylobacter jejuni* による集団食中毒の一例. 横浜衛研年報, 21 : 61—64.
- [70] 小岩井健司, 三瓶憲一, 内村真佐子, 七山悠三 (1982) : 千葉県内の高校で発生した *Campylobacter jejuni* による食中毒. 千葉衛研報告, 6 : 27—29.
- [71] 水野照三, 野田朱実, 笠倉貞男, 渡辺恒明 (1983) : 昭和56年, 57年度に栃木県内で発生した *Campylobacter* による集団下痢症について. 栃木県衛研所報, 13 : 89—94.
- [72] 谷川博利 (1983) : *Campylobacter jejuni* による食中毒. 宮崎衛研所報, 24, 19—23.
- [73] 大谷 寛, 井藤典彦, 楠山和弘, 神木照雄, 松本晋, 伊東慎介, 武田真太郎, 太田安之 (1983) : 中学校で発生した *Campylobacter jejuni* による食中毒について. 和歌山県衛公研年報, 29 : 167—172.
- [74] 伊藤 武, 斎藤香彦, 柳川義勢, 甲斐明美, 高橋正樹, 稲葉美佐子, 高野伊知郎, 坂井千三, 大橋 誠 (1983) : 1979—1981年間に東京都内で発生した *Campylobacter jejuni* による15事例の集団下痢症に関する調査. 感染症誌, 57 : 576—586.
- [75] 吉崎悦郎, 坂崎利一 (1979) : *Campylobacter* 腸炎 B検査方法. Media circle. 24 : 325—328.
- [76] 伊藤 武, 斎藤香彦 (1982) : *Campylobacter* 属. Med. Technol., 10 : 219—226.
- [77] Itoh, T., Saito, K., Yanagawa, Y., Sakai, S. and Ohashi, M. (1982) : Serological typing of thermophilic *Campylobacters* isolated in Tokyo. In Newell, D. G. ed. *Campylobacter* : Epidemiology, Pathogenesis and Biochemistry. p. 106—110. MTP Press, Lancaster.
- [78] Mouton, R.P., Velkcamp, J.J., Lauwers, S. and Butzler, J.P. (1982) : Analysis of a small outbreak of *Campylobacter* infection with high morbidity. Newell, D. G. ed. *Campylobacter* : Epidemiology, Pathogenesis and Biochemistry. p. 129—134. MTP Press, Lancaster.

広島県内医療機関における病原細菌検出状況 (1982—1983年)

広島県臨床細菌研究会*

Surveillance for Bacterial Infections in Hiroshima District During 1982—1983

HIROSHIMA WORKING GROUP ON CLINICAL BACTERIOLOGY*

(Received Aug. 31, 1984)

緒 言

「微生物検査情報システム化に関する研究班」の具体的成果として、「病原微生物検出情報——月報」の第1号が発行されたのは1980年3月である〔1〕。その後毎月、全国の衛生研究所における病原菌検出の実状が報告され、地域的な状況のみならず、全国的な趨勢の把握が可能となった。その後さらに検疫所と病院検査室の検出情報が加えられ、わが国唯一の総合的な病原微生物検出情報に発展した。

事業主体の一翼である衛生研究所が対象とする病原細菌は、主として法定伝染病菌と食中毒細菌であり、その調査対象も流行および集団発生事例が圧倒的に多数を占めている。これに反し、病院検査室および医師会臨床検査センターでは散发患者を対象として病原菌検出が実施されている。したがってその検出情報は、その地域の患者の発生状況を端的に示すものといえる。広島県下の病院情報については、広島県衛生研究所が収集・還元を努めている。定点病院の設定は都道府県ごとに一様ではないが、広島県では情報収集開始の時点から県下全域を対象とする広域的な実施に踏み切り、現在にいたっている。これを可能としたのは、1977年のサルモネラ症散发患者の全県的な激増の指摘であった〔2〕。これを機に、医療機関と衛生研究所の共同事業として、サルモネ

ラ症に関する情報の収集と還元が月報の形で開始されたのである〔3〕。

1982年1月に始められた病院検査室情報の収集・還元事業はこのネットワークを基盤にして順調に進み、すでに3年目に入っている。何らかの結論を得るには日がお浅いが、本報では、これまでの2年間に蓄積された県下の病院検査室情報を集約し、菌種ごとの検出頻度ならびに主要な菌種の季節的変動について述べる。

なおこの事業は、県下の多くの病院検査室の担当者の協力のもとに継続されている。参加病院および担当者名は最後の項にまとめて記載した。

病原菌検出情報の収集

情報収集の定点病院としては、広島県臨床衛生検査技師会の協力によって、細菌検査が恒常的に実施されている病院と地区医師会の臨床検査センターを選出した。これらの医療機関は1978年以来継続実施しているサルモネラ症実態調査〔3〕の共同研究機関である。

対象病原細菌は、微生物検査情報システム化に関する研究班によって定められた「病原菌検出状況報告書」(病原微生物検出報告書書式 3-B)〔4, 5〕に選定されているものとしたが、腸管系の病原細菌についてはそれ以外の菌種の検出例も収集対象とした。

上記の書式にしたがって定点機関から毎月の検出事例

*参加機関および担当者名は末尾に記載した。論文執筆者・連絡先：西尾隆昌〔広島市南区宇品神田1—5—70 広島県衛生研究所〕。

*TAKAMASA NISHIO, Hiroshima Prefectural Institute of Public Health, On Behalf of Members of Hiroshima Working Group on Clinical Bacteriology.

表1. 病原細菌検出事例数

菌種・群・型	検出事例数		
	1982年	1983年	合計
01 <i>Escherichia coli</i> *	107	14	121
02 <i>Shigella</i> (A-D total)	8	24	32
03 <i>Salmonella typhi</i>	12	15	27
04 <i>Salmonella paratyphi A</i>	—	2	2
05 <i>Salmonella paratyphi B</i> (T ⁻) ^{a)}	—	3	3
<i>Salmonella paratyphi B</i> (T ⁺) ^{b)}	27	34	61
06 Other <i>Salmonella</i> , B	94	125	219
07 " C1	21	41	62
08 " C2	45	38	83
09 " D1	9	18	27
10 " D2	—	—	—
11 " E1	1	3	4
12 " E2	—	—	—
13 " E4	1	—	1
14 " G	5	2	7
15 " K	2	6	8
16 " その他(C4)	6	3	9
17 " 群不明	—	—	—
18 <i>Yersinia enterocolitica</i>	2	5	7
19 <i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	1	—	1
20 <i>Vibrio cholerae</i> , O1	—	—	—
21 <i>Vibrio cholerae</i> , O1 以外	—	—	—
22 <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	153	146	299
23 <i>Campylobacter jejuni/coli</i>	536	837	1373
24 <i>Staphylococcus aureus</i> *	32	9	41
25 <i>Clostridium perfringens</i> *	—	—	—
26 <i>Clostridium botulinum</i> , E	—	—	—
27 " その他	—	—	—
28 <i>Bacillus cereus</i> *	14	1	15
29 <i>Neisseria gonorrhoeae</i>	148	231	379
30 <i>Neisseria meningitidis</i>	—	4	4
31 <i>Streptococcus</i> , A	894	982	1876
32 " B	163	381	544
33 " C	12	8	20
34 " G	6	21	27
35 " 不明	401	84	485
36 <i>Corynebacterium diphtheriae</i>	—	—	—
37 <i>Bordetella pertussis</i>	—	—	—
38 <i>Streptococcus pneumoniae</i>	846	1472	2318
39 <i>Legionella pneumophila</i>	—	—	—
40 <i>Leptospira</i>	—	—	—
41 <i>Entamoeba histolytica</i>	—	1	1
42 <i>Malaria</i>	—	—	—

表1. つづき

菌種・群・型	検出事例数		
	1982年	1983年	合計
101 <i>Plesiomonas shigelloides</i>	• ^{c)}	6	6
104 <i>Vibrio fluvialis</i>	2	1	3
115 <i>Vibrio mimicus</i>	•	1	1
111 <i>Aeromonas hydrophila/sobria</i>	•	28	28
118 <i>Haemophilus influenzae</i>	•	1990	1990
119 <i>Klebsiella pneumoniae</i>	•	2978	2978
<i>Vibrio vulnificus</i>	—	1	1
<i>Edwardsiella tarda</i>	—	1	1
合 計	3548	9516	13064

*急性胃腸炎の原因と考えられる事例。

a) T⁻: d-酒石酸陰性。

b) T⁺: d-酒石酸陽性。

c) 1982年は集計対象外菌種 (No.101~119)。

数(同一患者からの反復検出例は初回分のみ)を翌月の10日までに広島県衛生研究所に収集し、全県的な情報として国立予防衛生研究所の血清情報管理室に送付するとともに、県下の医療機関、医師会、保健所、県衛生主管部等に全国情報を添付して還元している。*Campylobacter* の分離事例については一定様式で患者情報を、また *Salmonella* の分離事例については同様の患者情報と分離菌株をそれぞれ収集し、「サルモネラ症情報」および「*Campylobacter* 腸炎情報」として同様に還元している。衛生研究所はこれらの情報を翌月の15日に発送している。

病原細菌検出状況

2年間に検出された病原細菌の菌種およびその検出事例数を表1に示した。表中の数値は有症者からの検出例であって、いわゆる保菌事例(無症状の病院職員や妊婦からの検出事例)は集計から除外した。

腸管系の病原細菌では *Campylobacter* が圧倒的に多数を占め、第2位の(法定伝染病菌以外の) *Salmonella*、第3位の *Vibrio parahaemolyticus* を大きく凌駕している。*Vibrio cholerae* は海外帰国者についての検出例も含めて、この2年間には検出されなかった。1983年に情報収集の開始された菌種のうち、*Aeromonas* はほぼ毎月分離され、また *Vibrio* 属のうち *V. fluvialis*、*V. mimicus* および *V. vulnificus* は、いずれも少数例ではあるが検出されている。なお *Escherichia coli* については、そのほとんどが病原大腸菌血清型の該当菌として報告された

表2. *Shigella* の検出状況

菌種・血清型	検出菌株数 ^{a)}	
	1982年	1983年
<i>S. flexneri</i> 1b		1
<i>S. flexneri</i> 2a	2	
<i>S. flexneri</i> 2b	1	1
<i>S. flexneri</i> 3a	3	2
<i>S. flexneri</i> 4		1(1)
<i>S. boydii</i> 4	1	1(1)
<i>S. boydii</i> 9	1(1) ^{b)}	
<i>S. sonnei</i>		18 ^{c)}
合計	8(1)	24(2)

- a) 括弧内は輸入事例数の再掲.
- b) 空港検疫所分離株は *S. boydii* の血清型 9. 県内医療機関分離株はC群多価血清とは凝集が認められるが、型別血清との反応は不明瞭.
- c) このうち13例は福祉施設での集団発生事例.

ものである.

呼吸器系の病原細菌では *Streptococcus pneumoniae* と A群 *Streptococcus* が主流をなしている. また1983年1月から情報収集の始められた菌種では, *Klebsiella pneumoniae* と *Haemophilus influenzae* の両菌の検出事例がいちじるしく多数にのぼり, 1983年においてはこの両者が首位と第2位の座を占めた. なお *Streptococcus* の群不明株が1982年に比して1983年には大幅に減少しているが, これは群別用血清および同定用キット類の普及とその有用性の啓蒙の結果であると考えられる.

性病の病原菌である *Neisseria gonorrhoeae* は毎月10~30の検出事例が報告されている.

法定伝染病菌である *Salmonella typhi*, *S. paratyphi A*, *S. paratyphi B* および *Shigella* については, 県下の確認事例のほとんどすべてが病院検査室での菌検出事例である. 赤痢事例は表2に示すごとく, 3菌種8菌型が分離された. このうち海外からの輸入事例と考えられたのは *S. boydii* の2例, *S. flexneri* の1例であった. 1982年の *S. boydii* 4の検出事例については海外との関連性が明らかにされなかった. このほかの輸入事例としては, *S. typhi* と *Vibrio parahaemolyticus* の各1例が認められた. 輸入事例は *S. typhi* の1例(南米)と *S. flexneri* 4の1例(フィジー) 以外はアジア地域からの帰国者であった.

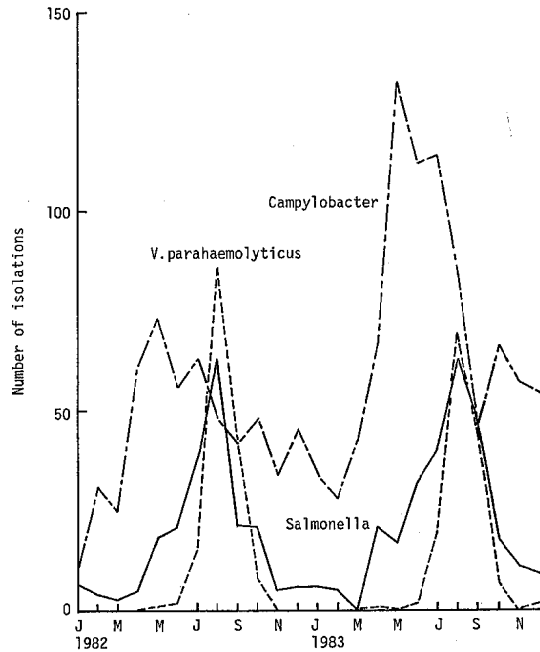


図1. *Campylobacter*, *Salmonella* および *Vibrio parahaemolyticus* の月別分離状況.

主要病原菌検出事例数の季節的変動

腸管系病原細菌の主流をなしている *Campylobacter*, *Salmonella* および *Vibrio parahaemolyticus* について, 季節的消長を観察した. 図1はそれらの2年間における月別検出事例数の推移を示したものである. *V. parahaemolyticus* は両年とも, 8月にきわめて鋭角的なピークを持つ季節分布を示した. *Salmonella* についても同様な傾向が認められたが, 冬期にも少数ながら分離されている. *Campylobacter* は前2者とはいちじるしく様相を異にしており, 盛夏の候よりもやや早く, 5月あるいは5~7月に幅広い裾野をもつかなり広角的なピークが認められた. また厳寒期においても, 他の2菌種よりもはるかに多数分離されている.

図2は主として呼吸器系疾患事例から高頻度に分離される菌種の月別分布を示したものである. A群 *Streptococcus* については両年とも11月に大きなピークが認められた. *Streptococcus pneumoniae* は1982年にはA群 *Streptococcus* とほぼ同様な季節分布を示したが, 1983年には前年とは異なって, 2~5月に分離事例が激増しており, かなりの規模の流行のあったことが知られた. *Klebsiella pneumoniae* と *Haemophilus influenzae* については1983年1月から情報収集が始められた. *K. pneu-*

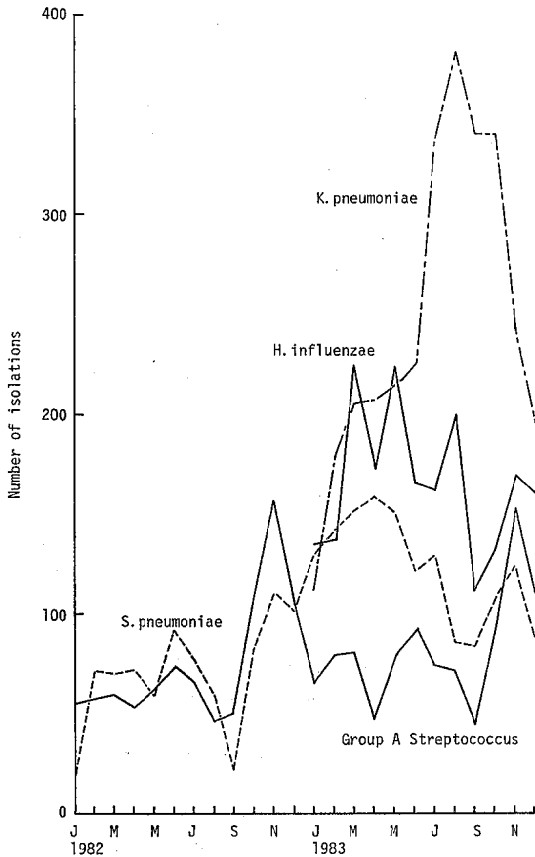


図2. *Streptococcus pneumoniae*, group A *Streptococcus*, *Haemophilus influenzae* および *Klebsiella pneumoniae* の月別分離状況。

moniae は盛夏の候に分離事例数が極大に達しているが、*H. influenzae* は月ごとにかかなりの増減はあるものの、きわだった季節的特徴は認められなかった。

なおA群 *Streptococcus* の分離事例数の推移は、県下の60の医療機関を定点とする感染症サーベイランス事業（臨床診断情報——週報）の溶連菌感染症患者数の推移にはほぼ完全に一致した。

考 察

1982年1月から全国的に病院検査室情報の収集が始められたが、広島県においてはそれまでに整備されていたサルモネラ症実態調査〔3〕のネットワークがそのまま活用されたので、全国的にももっとも早期にはほぼ県下全域からの情報収集が可能な状態にあった。したがって、この2年間の検出情報は、県下の患者の発生状況をかな

り明確に示しているものと思われる。

Salmonella, *Vibrio*, *Campylobacter* 等の腸管系病原細菌の散発患者からの分離事例数は、いずれも届出食中毒事例における患者数を大きく凌駕し、食中毒菌による「届出のない」胃腸炎散発患者の県下全域における多発の実態を指摘する結果が得られた。サルモネラ症については、1978年以降継続して患者の把握に努めているが、例年ほぼ同様の患者発生パターンが続いている〔3〕。また *V. parahaemolyticus* による胃腸炎散発患者もほぼ7～9月に集中しており、全国的な本菌食中毒事例の発生パターン〔6〕に類似のものといえる。

近年注目されている *Campylobacter* 腸炎〔7—11〕については、わが国においても多数の疫学的ならびに臨床的研究成果が報告されているが、散発患者についての全県的な継続調査成績の解析報告は見当たらない。また広島県衛生研究所が原因究明にあたった届出食中毒事例のなかでは、これまでにわずかに2例のみが本菌によるものと確認されているに過ぎない〔広島県衛生研究所業務年報（昭和57年度）, p. 32—33, 1983; 広島県衛生研究所業務年報, 第18号, p. 32—33, 1984〕。しかしながら散発患者は年間を通じて発生していることが明らかにされ、とくに晩春から初夏にかけての多発が目されるのである。*Salmonella* および *V. parahaemolyticus* による胃腸炎患者は例年8月を中心に多発しており、気温との相関が明確に認められている。しかし *Campylobacter* 腸炎患者はそれよりもかなり早い時期にもっとも頻発している。そしてこの *Campylobacter* 腸炎患者の70%以上が10歳未満の年齢層である〔広島県衛生研究所業務年報, 第18号, p. 14, 1984〕。このような患者発生要因の究明は今後の重要な研究課題である。

A群 *Streptococcus* については、臨床情報（溶連菌感染症）と菌検出情報の両者の患者の推移がほぼ完全に一致する成績が得られたが、分離菌株についてはT抗原型その他の疫学マーカーの解析が行われていないので、流行の実態についての追究は今後問題である。なお溶連菌感染症の流行には、気象因子の関与の大きいことが指摘されている〔12〕が、その要因の追究、解析を含めての研究が必要であろう。また *Streptococcus pneumoniae* についてもまったく同様であり、分離事例数のもっとも多い *Klebsiella pneumoniae* と *Haemophilus influenzae* の場合も、現在のところは分離事例の推移の把握にとどまっている。これらの大部分は小児科領域ならびに日和見感染の患者であろうと考えられるが、県下の医療機関でこれだけ多数の患者から分離されている事実は、疫学

的究明の必要性を明示しているといえる。

近年は赤痢の集団発生事例がいちじるしく減少し、この2年間の把握患者は1983年12月の福祉施設の事例以外はすべて散发患者である。これらの散发赤痢患者ならびに腸チフス患者はいずれも医療機関の検査室での菌検出確認患者である。法定伝染病探索のアンテナの役割を担っているのである。病院検査室と衛生研究所を結ぶ情報網の整備はこれらの分離菌についてのごく早期の鑑別・同定を可能としており、またコレラの疑われる場合には分離平板の段階で衛生研究所に搬入されている。したがって、従前よりも法定伝染病の発生を少なくとも1～3日は早く認知しうる場合が少なくない。

このように、県下の医療機関検査室と衛生研究所のネットワークは、法定伝染病の早期認知に大きく貢献しているが、それに附随して衛生研究所は広範な菌種についての「同定機関」の役割を担いつつある。設置当初から法定伝染病菌と食中毒菌を主たる対象としてきた衛生研究所にとっては、これら以外の菌種、とくに日和見感染に関与する菌種についての知見に乏しいのは事実である。しかし幸いにも、最近細菌同定用キット類の普及がめざましく、広範な菌種をきわめて高い精度で同定しうる事が確認されている。病院検査室で検出される菌種はますます複雑化の度合いを高めつつあるが、自動同定機器の導入が困難な現状では、同定用キットによる同定精度の向上と迅速化が期待されるところである。

1982年1月に収集が開始された医療機関の病原菌検出情報は、いくつかの問題点はあるにしても、地域における細菌感染症の実態をかなり高い精度で把握していると考えられる。速報性を重視した情報の広範な活用、蓄積と解析を通じての臨床分野への貢献が期待される。

要 約

県下の医療機関からの病原菌検出情報の収集とその還元事業は順調に軌道に乗り、初年度の1982年には月平均296件、1983年には対象菌種の増加もあって、毎月600～1000件の菌分離事例が報告された。

腸管系病原菌としては *Campylobacter*, *Salmonella*, *Vibrio parahaemolyticus* が上位を占めた。これらのうち *Campylobacter* は年間を通じて分離された(5～7月にピークを認めた)が、後2者は盛夏(8月)にきわめて鋭角的なピークをもつ分布を示した。呼吸器系では、*Klebsiella pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, A群 *Streptococcus* が主流を占め、それらの流行時期はそれぞれ異なっていたが、いずれも

年間を通じて多数分離されている。このような医療機関の分離実態からすれば、届出食中毒事例よりもはるかに多数の散发胃腸炎患者が発生しており、またそれを凌ぐ莫大な数の日和見感染患者が存在するといえる。

医療機関検査室と衛生研究所の情報網の整備は、病原菌の迅速な鑑別・同定を通じて、従前よりも法定伝染病の早期認知を可能としている。医療機関からの情報は毎月、月報の形にまとめてそれに簡単な解説を付し、全国集計分とともに県下の医療機関、医師会、行政主管部、保健所等に還元している。

文 献

- [1]微生物検査情報システム化に関する研究班(1980): 病原微生物検出情報——月報, 第1号.
- [2]西尾隆昌, 宮崎佳都夫, 中森純三, 相坂忠一, 横坪慎一, 渡辺陽子, 梶山啓子, 土井秀之, 矢口博美, 阿津地秋子, 横田和子, 浜中英紗子(1978): 広島地方のサルモネラ症: 散发患者の急増とその実態把握の必要性. 臨床と細菌, 5: 169—177.
- [3]広島県臨床細菌研究会(1983): 広島地方のサルモネラ症: 1978～1982年の散发患者発生状況. 臨床と細菌, 10: 227—235.
- [4]微生物検査情報システム化に関する研究班(1981): 病原微生物検出情報(月報), 第22号, p. 18—19.
- [5]微生物検査情報システム化に関する研究班(1983): 病原菌検出状況報告書書式3の変更について.
- [6]西尾隆昌(1979): 細菌性食中毒20年の軌跡. 広島大学医誌, 27: 217—234.
- [7]Skirrow, M.B. (1977): *Campylobacter enteritis*: a "new" disease. Brit. Med. J., ii: 9—11.
- [8]Butzler, J.P. and Skirrow, M.B. (1979): *Campylobacter enteritis*. Clin. Gastroenterol., 8: 737—765.
- [9]Blaser, M.J. and Reller, L.B. (1981): *Campylobacter enteritis*. New Engl. J. Med., 305: 1444—1452.
- [10]吉崎悦郎, 神木照雄, 坂崎利一, 田村和満(1982): 散发性 *Campylobacter* 腸炎に関する調査研究. 感染症誌, 56: 1153—1159.
- [11]伊藤 武, 斉藤香彦, 柳川義勢, 甲斐明美, 高橋正樹, 稲葉美佐子, 高野伊知郎, 坂井千三, 大橋 誠(1983): 1979年～1981年に東京都内で発生した *Campylobacter jejuni* による15事例の集団下痢症に関する調査. 感染症誌, 57: 576—586.

〔12〕 森田盛大, 石田名香雄(1984): 感染症と気象に関する統計学的研究(第1報)——特に溶連菌感染症について. 感染症誌, 58: 750—757.

共同研究機関*および担当者

マツダ株式会社マツダ病院臨床病理研究検査科

山田純子, 宇野正昭, 有馬愛子, 直良有美

広島大学医学部附属病院中央検査部

板羽秀之, 石田昌子, 小田サキ子

広島赤十字病院検査部

西村昭一, 小原忠博

広島県立広島病院第1研究検査科

池田美佐子, 室木邦生, 藤上良寛, 桑原正雄

社会保険広島市民病院臨床検査部

浜中美紗子, 熊谷和子, 佐々木恵美, 小山秀樹

広島市立安佐市民病院臨床検査部

重光昌信, 野神道栄

広島市立舟入病院検査科

槇坪慎一, 高木保子, 古谷和男

広島鉄道病院中央検査室

鬼村賢太郎, 羽原富夫

広島市医師会臨床検査センター

山崎雅昭, 松本道雄, 三浦辰三郎

広島医療生活協同組合広島共立病院臨床検査科

香西幸恵

広島県厚生農業協同組合連合会広島総合病院臨床検査科

林田静枝

国立呉病院臨床検査科

土井秀之, 河野通子, 下中秋子, 横田和子
国家公務員共済組合連合会総合病院呉共済病院中央検査科

藤原由紀子

労働福祉事業団中国労災病院中央検査科

松原 薫, 山口邦夫

呉市医師会臨床検査センター

神田洋子, 松岡真由美, 中本千代美

三原赤十字病院臨床検査部

三藤 孝

総合病院三菱三原病院臨床検査科

渡辺孝好

広島県厚生農業協同組合連合会尾道総合病院中央検査科

開原碩士

公立学校共済組合中国中央病院臨床検査科

池田妙子

国立福山病院研究検査科

福永政司

福山市市民病院臨床検査科

桑田正和

福山市医師会臨床検査センター

後藤 正

日本鋼管福山病院臨床検査科

小倉康晴, 池田洋子, 佐々木善宏

広島県厚生農業協同組合連合会府中総合病院臨床検査科

久保井範幸

広島県衛生研究所生物学部

西尾隆昌, (故)中森純三, 宮崎佳都夫

*「広島県臨床衛生検査技師会会員名簿(1984)」の順序に記載した。

広島県湯来町住民における横川吸虫感染状況

古本 曉美* 松尾 健** 仁王頭 敏***

Metagonimus yokogawai Infections among Inhabitants in Yuki-cho, Hiroshima

AKEMI FURUMOTO*, TAKESHI MATSUI** AND SATOSHI NIOUZU***

(Received Sept. 3, 1984)

緒 言

わが国における横川吸虫の疫学に関する研究は、その発見以来おびただしい数にのぼっており、アユ生息河川流域住民は高率に感染していることが報告されてきた。本県においては、沖波ら(1960)〔1〕の双三郡作木村住民を対象とした調査での本虫保有率24.3%、末田(1965)〔2〕の山県郡太田川上流漁業組合とその家族の調査での22.8%などの成績があるが、最近の報告はみあたらない。著者らは本県の西北部に位置する水内川流域の湯来町において、1981~1982年にかけて横川吸虫を主体とした調査を行ってきたのでその結果を報告する。

調査の対象ならびに方法

1. 調査地域の概況

調査の対象とした湯来町は、広島県の西北部に位置し、総面積787.1km²の大半は山林で占められている。中国山脈より発する水内川(太田川支流、一級河川、全長22.1km)が町の中心部を貫流しており、川に沿って上水内地区と下水内地区、山合に砂谷地区があり、町は大きく3区分されている(図1)。人口は6,049人(1981年10月)であるが、このうち成人1,101名(下水内364名、上水内311名、砂谷426名)と児童生徒781名を対象として調査を行った。

2. 調査方法

前記の対象者の糞便を1981年9月から1982年2月にかけて、約5ml容量のプラスチック製で密封できる容器

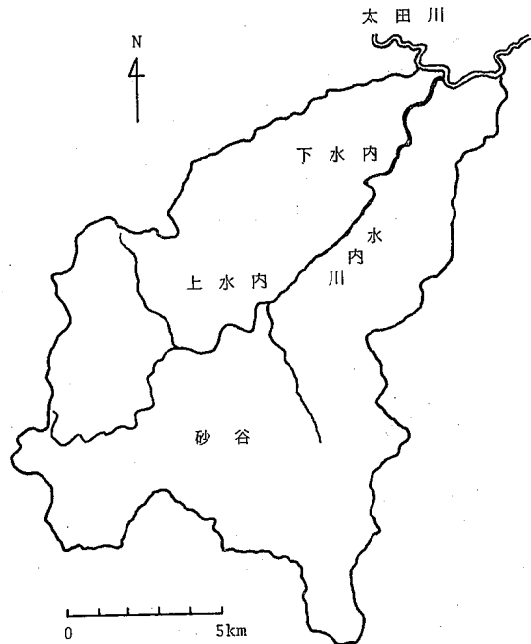


図1. 湯来町概略図。

(ワンタッチ)に採取し、遠心沈殿法(AMSⅢ法)によって虫卵の検索を行った。同時にアユの摂食状況、健康状態についてのアンケート用紙を配布し、糞便と同時に回収して集計を行った。また、横川吸虫被囊幼虫の寄生状態をみるため、1982年8月に水内川中流でアユを採取した。これらのアユについては、大島ら(1966)〔3〕

* 広島県立病院: Hiroshima Prefectural Hiroshima Hospital.

** 広島県衛生研究所: Hiroshima Prefectural Institute of Public Health.

*** 広島県廿日市保健所: Hiroshima Prefectural Hatsukaichi Health Center.

表1. 湯来町住民における寄生虫卵保有状況

虫 卵	虫卵保有者数(%)	
	児童生徒(781)*	成人[1101]*
横川吸虫	4 (0.5)	72 (6.5)
回 虫	1 (0.1)	4 (0.4)
べん虫	1 (0.1)	3 (0.3)

*被検者数.

の方法に従い、体側の背びれ下側線上1cm幅部分のうろこ100枚をメスで採取し、顕微鏡下で観察してメタセルカリアの数を計測した。

調査成績および考察

1. 横川吸虫の住民への感染状況

1) 学童と成人の寄生虫卵保有率の比較

児童生徒ならびに一般成人の寄生虫卵検査結果を表1に示した。児童生徒(781名)では、横川吸虫卵保有者は4名(0.5%)、回虫卵保有者1名(0.1%)、べん虫卵保有者1名(0.1%)とそれぞれ低率であった。

これに反し、一般成人(1,101名)では、横川吸虫卵保有者は72名(6.5%)認められ、低年齢層に比していちじるしく高率であった。また回虫卵保有者4名(0.4%)とべん虫卵保有者3名(0.3%)が認められた。横川吸虫については、影井[4]、長野[5]らも述べているとおり、児童生徒より一般成人にはるかに高い寄生率が認められた。さらに、低率ではあるが回虫、べん虫についても食生活の向上した今日なお根強く残存している状況がうかがえた。なお最近では、全国的に横川吸虫感染者が急増しているといわれている[6]。今後の動向に注目したい。

2) 性別年齢別横川吸虫卵保有状況

表2に示したように、虫卵保有者76名中男性49名(64.5%)、女性27名(35.5%)で、男性が女性に比較して高率に感染していた(男女比=1.81:1)。一般成人においては、中高年齢層において高率であるが、これはアユを酒の肴として「背ゴシ」や「さしみ」などで生食する機会の多いことによるものと思われる。

3) 成人の地域別横川吸虫卵保有状況

表3に示したように、虫卵保有率の最も高かったのは下流域の下水内地区で、364名中49名(13.5%)、ついで砂谷地区の426名中14名(3.3%)、上水内地区の311名中9名(2.9%)であった。下水内地区が他の地区に比較して

表2. 性別・年齢別にみた横川吸虫卵保有状況

年 齢 群	虫卵保有者数(%)		
	男	女	合計
0 — 9	0	0	0
10 — 19	1	3	4 (5.3)
20 — 29	4	1	5 (6.6)
30 — 39	11	3	14 (18.4)
40 — 49	8	3	11 (14.5)
50 — 59	12	11	23 (30.3)
60 — 69	7	3	10 (13.2)
70 —	6	3	9 (11.8)
合 計*	49	27	76 (100)

*男女比=1.81:1.

表3. 地区別寄生虫卵保有状況

地 区	被検者数	虫卵保有者数(%)		
		横川吸虫	回虫	べん虫
上水内	311	9(2.9)	4(1.3)	3(1.0)
下水内	364	49(13.5)	—	—
砂 谷	426	14(3.3)	—	—
合 計	1101	72(6.5)	4(0.4)	3(0.3)

いちじるしく高い保有率を示したのは、水内川下流は川幅が広く、アユの漁獲量も多いということと相まって、住民が積極的にアユを採食しているためと思われる。

2. アンケート調査

表4はアンケート調査の結果まとめたものである。虫卵保有者64名中53名(82.8%)がアユを摂食し、うち33名(51%)がアユを生食していると回答した。このアユ生食者は女性よりも男性はるかに高率であり、また地域的分布も糞便の検査結果とほぼ一致していた。この事実はアユ生食の食習慣が横川吸虫寄生率に明瞭に反映することを示しているといえる。なお、アユ喫食者で生食をしない群の感染については、加熱不十分なアユの喫食、あるいは調理時の手指汚染等の可能性が考えられる。

健康状態は概して良好で、下痢、貧血、頭痛などの軽い自覚症状もみられるが、それらと横川吸虫感染との関

表4. アンケート調査結果

地区	アンケート実施数	性別	アユ喫食	アユ生食	健康	便秘	貧血	頭痛	下痢
下水内	43	男	25	23	19	5	3	3	2
		女	18	13	12	10	8	3	1
上水内	8	男	5	4	4	1	1	2	2
		女	3	3	3	1	1	1	0
砂谷	13	男	10	7	7	3	0	0	0
		女	3	3	2	1	0	0	0
合計	64	男	40	34	26*	30	9	4	4
		女	24	19	7**	17	12	9	4

* 65.0%.

**29.2%.

係は不明である。

3. アユにおける横川吸虫被嚢幼虫の寄生について

水内川中流で捕獲した17匹のアユのうち、6匹(35%)に被嚢幼虫が認められた(表5)。大島ら〔3〕は、ある河川のアユの横川吸虫感染状況は、8月～9月に河川の中流域で捕獲されたアユ10～20匹の背びれ下側線のすぐ上部1cm帯のうろこ200枚の被嚢幼虫数平均値を、感染指数として表現するのが適当であり、1～4を軽感染、5～9を中等度感染、10～19を高度感染、20以上を濃厚感染とすると述べている。これに従うと、今回の調査で得られた水内川のアユの感染指数は0.9となり、これは大島らの軽感染区分の下限以下の数値であった。

ま と め

今回の調査で、湯来町における横川吸虫感染状況は一般成人について6.5%、児童生徒について0.5%という値が得られた。最近の寄生虫症の減少傾向のなかにおいて、この数値は無視しえないものであると思われる。寄生虫症としては临床上軽視されがちであるが、現在で

表5. アユにおける横川吸虫被嚢幼虫寄生状況*

検体番号	重量(g)	メタセルカリア数	検体番号	重量(g)	メタセルカリア数
1	35.6	2	10	31.3	0
2	44.0	0	11	27.3	1
3	52.6	2	12	27.5	0
4	37.4	0	13	36.6	0
5	25.8	0	14	33.2	1
6	43.0	1	15	27.5	0
7	38.8	1	16	35.0	0
8	51.1	0	17	54.0	0
9	33.2	0			

* 感染指数=(8×2)/17=0.9

は、アユの生食は河川流域の住民以外にも拡大しているものと思われ。湯来町下水内地区の成人の感染実態とそれに直結するアユの生食の習慣、ならびに感染指数は小さいものの、被嚢幼虫を有するアユが確実に存在することは、アユの生食についての公衆衛生的見地からの教育の必要性を明瞭に示しているといえる。

文 献

- 〔1〕 沖波 実, 千治松弥太郎 (1960): 広島県衛生研究所報, 10: 7-11.
- 〔2〕 末田 尚 (1965): 広島医学, 18: 420-423.
- 〔3〕 大島智夫, 影井 昇, 木畑美知江 (1966): 寄生虫誌, 15: 161-167.
- 〔4〕 影井 昇 (1965): 公衆衛生院研究報告, 14: 213-227.
- 〔5〕 長野耕二, 當 数哉 (1978): 衛生検査, 27: 775-781.
- 〔6〕 楠本正康, 河路明夫 (1983): 今日の風土病と感染症, 第1版, p. 51-53, 環境衛生問題研究会, 東京.

Salmonella nagoya と *Klebsiella oxytoca* の混合汚染による食中毒事例

小川 博美* 岸本 敬之* 得能 弘志*
佐々木 実己子* 福田 伸治*

An Outbreak of Food-borne Gastroenteritis due to Mixed Contamination of *Salmonella nagoya* and *Klebsiella oxytoca*

HIROMI OGAWA, TAKASHI KISHIMOTO, HIROSHI TOKUNO,
MIKIKO SASAKI AND SHINJI FUKUDA

(Received Oct. 1, 1984)

序 論

食中毒原因菌の検索にあたっては、1982年従来¹の7菌種に加え、あらたに8菌種が指定〔1—3〕され、また近年細菌毒素学的検査の進歩や海外渡航者の急増等により、ますます細心の注意を払った幅広い菌検索の対応が求められるようになった。こうした中で著者らは、1982年6月、発症期間が長く、発症ピークが複相性を示す特異な集団食中毒事例の菌検索において、*Salmonella nagoya* の分離と共に、従来散発性の原因不明下痢症〔4—7〕や出血性あるいは、偽膜性腸炎からしばしば分離報告〔8—11〕されてきた Indole 陽性の特異な菌 *Klebsiella oxytoca* を分離し、両菌の関与した食中毒事例と史料される集団食中毒事例に遭遇した。*S. nagoya*〔12〕は、近年ますます多様化する *Salmonella* 血清型のなかにあっても、その集団食中毒事例の報告は、比較的少なく、また *K. oxytoca* による国内での集団発生事例報告は、単独あるいは他菌との混在をとわず未だみられない。

K. oxytoca の腸炎起病性については、一次的腸炎起病性の有無を含め未解明の部分が多くはあるが〔8, 10〕、食品細菌の立場から興味あると思われるので、その概要を報告する。

材料および方法

1. 原因菌検索

1982年6月3日、高宮町学校当局から「腹痛、下痢、頭痛を訴える児童が多数おり、欠席児童も相当数ある」旨所轄の可部保健所に連絡が入った。カゼと食中毒の両面から調査を開始したところ、患者は共同給食摂食者に限定してみられることから、食中毒を疑い直ちに原因菌検索および疫学調査を実施した。

原因菌検索のため採取した材料は、推定原因食として6月1日分の給食検食（魚フライ、タルタルソース、はるさめスープ）と6月2日分検食（チキンカレー、ヨーグルト）の計9検体と、直ちに採取できた有症患者便15件および従業者便3件の総計27検体である。検査方法は、食品衛生検査指針Ⅰ〔13〕に従い常法により、また新たに指定された食中毒菌については、厚生省通牒第59号〔1〕に準じそれぞれを実施した。

2. 分離菌の生化学的性状検査

直接法、増菌法により分離した *Salmonella* 様、*Klebsiella* 様菌株については、Edwards and Ewing〔14〕の方法に準じて生化学的性状検査を行い菌同定を実施した。

3. 分離菌株の血清学的検査

*広島県衛生研究所：Hiroshima Prefectural Institute of Public Health.

分離同定した *Salmonella* 菌株95株について、サルモネラO群診断用血清、H抗原診断用およびH抗原相誘導用血清（デンカ生研）を用い常法により血清型別試験を行った。また性状一致をみた *K. oxytoca* 分離株55株については、莢膜型別用血清（Difco）を用いスライド凝集反応によりK型別を実施した。

4. 分離菌株の薬剤感受性

薬剤感受性試験は、昭和薬化工の12剤と栄研化学の5剤計17剤について、ディスク法により、Tryptic soy broth (Difco) での37°C、18hr 培養菌液を供試菌液とし、平板培地は日本化学療法学会の定めた方法〔15〕に準じて、変法 Mueller-Hinton agar（日水製薬）を用い実施した。

5. 原因食「タルタルソース」の細菌学検査

原因菌が確定した段階で、冷蔵保存されていた原因食「タルタルソース」（調理後7日）について、原因菌の定量および細菌学的検査を実施した。*Salmonella* の定量は5本立最確数法とし、使用培地はEEM培地（日水製薬）での前培養、ついでSBG培地（日水製薬）24時間培養とした。

Klebsiella については、MLCB 平板（日水製薬）、DHL 平板（日水製薬）を使用シコンラージュ法による。さらに常法に従って一般生菌数、大腸菌群数、*Escherichia coli* 最確数の測定も併せて実施した。

6. *Klebsiell oxytoca* の毒素産生能検査

K. oxytoca の分離代表株についてST、LT毒素産生能検査を実施した。ST産生能については、3日齢ICR系マウスを用いGiannella〔16〕の方法によるSuckling mouse test により行った。供試菌液としては、Casamino acid-yeast extract (Difco) での37°C 24hr 振盪培養液を用いた。LT産生能については、V-ET RPLA キット（デンカ生研）を用いて、コレラLT毒素との共通抗原毒素の有無を逆受身ラテックス凝集反応により行った。毒素産生用培地としてはEvans〔17〕のCAYE 培地を用い、37°C、24hr 振盪培養後 10,000rpm 30分遠沈し上清の滲液を供試した。

7. *Salmonella nagoya* と *Klebsiella oxytoca* のタルタルソース中での生残性

原因食「タルタルソース」中における両分離菌の保存温度別（5°C、25°C）の時間的消長について検討するため、事件当日と同様の方法で調理したタルタルソースを用い、再現実験を実施した。タルタルソースの組成（一人前80g）は、ゆで卵15g、玉ねぎ30g、パセリ1g、マヨネーズ15g、調味料少量（pH4.1）で、再調理

したタルタルソースの食品細菌学品質は、一般細菌数 10,000/g、大腸菌群10以下/gであった。添加菌量は、1夜ブイオン培養液を *Salmonella* 1,200/g、*Klebsiella* 3,000/g となるよう均質化、調整後、滅菌ポリ袋に分注し、それぞれ温度別に保存し7日間観察した。菌数の測定は、DHL 平板、MLCB 平板を使用シコンラージュ法とした。

結 果

A. 疫学的調査結果

1. 発生状況

1982年6月1日～5日にわたって、広島県高田郡高宮町の幼稚園、小学校、中学校の共同調理場からの給食摂取を原因として集団食中毒事例が発生した。摂食時間は、6月1日12時20分～30分で、患者発生は下痢、腹痛を主症状として6月1日17時からみられ、終発は6月5日11時であった。摂食者数は、園児、学童、生徒、給食従業員等を含め460名（内園児93名）で、うち発症者273名、発症率 59.3% であった。欠席者数は、6月3日56名、6月4日75名におよんだ。経過時間別発生状況を Fig. 1 に示した。間にも明らかなように24時間、48時間後と二つの発症ピークが認められ、平均潜伏時間は、41.3時間で、48時間を超える者が77名（28.2%）におよんだ。

2. 臨床症状

患者の主な臨床症状は、Fig. 1 に示すように腹痛251名（91.9%）、下痢181名（66.3%）、頭痛113名（41.4%）、発熱98名（35.9%）、嘔吐34名（12.5%）、嘔気34名（12.5%）であった。下痢については、大部分が水様便であるが、粘血便8名（4.0%）がみられ、下痢回数は平均3.2回（1～11回）であった。嘔吐は平均2回（1～4回）で、発熱は37°C～38°C未達が60.2%（59/98）、38°C～39°Cが21.4%（21/98）であった。

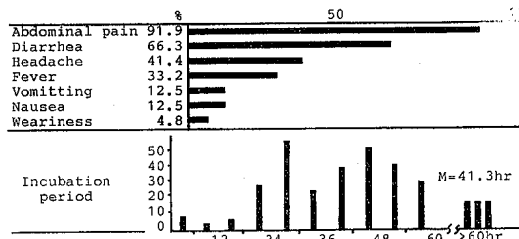


Fig. 1. Major clinical symptoms in patients and incubation period (n=273).

3. 疫学調査による原因食品の推定

摂食者 460 名について、6 月 1 日と 2 日の給食品目について χ^2 検定を行い原因食品の推定を行ったところ、6 月 1 日タルタルソース (χ^2 値=11.8)、6 月 1 日はるさめスープ (χ^2 値=8.04) の両品目が原因食として疑われた ($P=0.05$)。

B. 細菌学的検査結果

1. 原因菌の分離状況

Table 1. Isolation of *S. nagoya* and *K. oxytoca* from fecal specimens of patients and food handlers

Subject	No of isolations (%)	
	<i>S. nagoya</i>	<i>K. oxytoca</i>
Patients	15/15(100)	11/15(73.3)
Food handlers	3/3(100)	1/3(33.3)

Table 2. Biochemical characteristics of isolates of *Salmonella* and *Klebsiella*

Test or Substrate	Reaction ^{a)}		Test or Substrate	Reaction ^{a)}	
	<i>Salmonella</i>	<i>Klebsiella</i>		<i>Salmonella</i>	<i>Klebsiella</i>
Gram	-	-	Pectin liquefaction	-	+
Oxidase	-	-	Adonitol	-	+
O-F test	F	F	Amigdalín	-	+
Lactose	-	+	Arabinose	+	+
O N P G	-	+	Cellobiose	-	+
Dulcitol	+	+	Esculin	-	+
Salicin	-	+	Glucose acid (gas)	+(+)	+(+)
D-tartrate	+	+	Inositol	-	+
Mucate	-	+	Maltose	+	+
Malonate	-	+	Mannitol	+	+
Gelatinase	-	+	Melibiose	+	+
K C N	-	-	Raffinose	-	+
Hydrogen sulfide	+	-	Rhamnose	+	+
Urease	-	-	Sorbitol	+	+
Indole	+	+	Sucrose	-	+
Methyl red	+	-	Trehalose	+	+
Voges-Proskauer	-	+	Xylose	+	+
Citrate (Simmons')	+	+	Growth at 10C	•	+
Motility	+	-	Growth at 44. 5C	•	-
Lysine decarboxylase	+	+	Pigment on TSI	-	+
Arginine dihydrolase	+	-			
Ornithine decarboxylase	+	-			

a) + : positive reaction, - : no or negative reaction, F : fermentation.

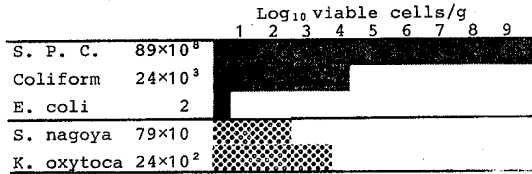


Fig. 2. Results of bacteriological examination and recovery of *S. nagoya* and *K. oxytoca* from tartar sauce.

原因菌検索結果は Table 1, Fig. 2 に示すように *Salmonella* および *Klebsiella* が患者便、原因食品から分離され、その他原因菌と思料される菌は分離されなかつた。

Salmonella は直接法で患者、従業員便の15/18名から分離され、さらに増菌法では全員から分離された。原因食品については、6 月 1 日分「タルタルソース」からのみ、直接法においても分離され、最確数法による定量結果は 5 °C 6 日間保存後において 79,000/100 g であった。

Indole 陽性の *Klebsiella* は、患者、従業員便の12/18名から分離をみ、直接平板上での菌数の出現は、*Salmonella* よりやや少ない状況であった。保存したタルタルソース中の *Klebsiella* 菌量は、2,400/g であった。

2. 分離菌の生化学的性状検査結果

分離菌の確認培養の結果、共通性状を示した *Salmonella* および *Klebsiella* 様菌株のうち、患者由来株および原因食由来株について、その代表株各20株の生化学的性状検査を行い Table 2 に示す結果を得た。

分離した *Salmonella* はその基本性状から、Kauffmann の分類の亜属 I に属したが、粘液酸発酵(-)の性状を異にしていた。坂崎 [18] は、粘液酸発酵(-)の例外 *Salmonella* として25血清型を報告し、その中に *S. nagoya* もみられ今回の分離株もこの報告と一致をみた。

また *Klebsiella* については、Indole 産生(+), 色素産生(+), ゼラチン液化(+), ベクチン酸溶解(+))という特異な性状がみられた。

3. 分離菌の血清学的検査結果

Salmonella 分離株90株の血清学的検査結果は、全分離株とも抗原構造 C₂: b: 1, 5 で一致し、生化学的性状検査結果とあわせて、*Salmonella nagoya* と同定された。

Klebsiella については、*K. oxytoca* の生化学的性状に

一致をみた25株は、いずれも K-19 に型別された。

4. 分離 *S. nagoya* と *K. oxytoca* の薬剤感受性

両菌株の薬剤耐性パターンは、*K. oxytoca* が PC, ABPC, ACPC, ABPC, SBPC SBPC に耐性を示した以外は、Table 3 に示すように両菌は類似した結果を示した。*K. oxytoca* の感受性については、1962年中村ら [19,20] は、11株中5株が SM に、1株が TC に耐性であったと報告しているが、今回の分離株は、各種ペニシリン系抗生剤に耐性を、SM, TC, KM に感受性を示した。この結果は、散発性下痢症由来株についての西山 [7], 瀬尾 [8], 戸谷 [9] の報告と一致している。

5. 原因食「タルタルソース」の細菌学的検査結果

原因食の細菌学的検査を実施したところ、Fig. 2 に示す結果が得られた。測定時のタルタルソースは、調理後 5°C で6日経過 (pH 4.1) したものであったが、官能的には異常を認めず、一般細菌数 $89 \times 10^3/g$ 、大腸菌群数 $24 \times 10^3/g$ 、*E. coli* MPN 20/100g であった。また、原因菌の定量結果は *S. nagoya* が、汚染大腸菌群対比 3/100 の $790 \times 10^2/100g$ 、*K. oxytoca* は 10/100 対比の $24 \times 10^2/g$ の数値であった。

6. タルタルソース中での両菌の消長

再調理したタルタルソース (pH 4.1) 中での *S. nagoya*、*K. oxytoca* について、発生日の気温 25°C と冷蔵保存

Table 3. Antibiotic sensitivity of isolates of *Salmonella* and *Klebsiella*

Antibiotic	Disk	Concentration	Sensitivity ^{a)}	
			<i>Salmonella</i>	<i>Klebsiella</i>
Penicillin	P Showa	20unit	+	-
Ampicillin	PcA Eiken	2,5,20μg	-	-
Amoxicillin	AMP Eiken	2,5,20μg	-	-
Cyclacillin	PcH Eiken	5,25,50μg	-	-
Carbenicillin	PcB Eiken	5,20,50μg	-	-
Sulbenicillin	PcS Eiken	5,20,50μg	-	-
Streptomycin	S Showa	50μg	+	+
Kanamycin	Ka Showa	50μg	+	+
Tetracycline	T Showa	200μg	+	+
Chloramphenicol	C Showa	100μg	+	+
Erythromycin	E Showa	50μg	-	-
Oleandomycin	Ol Showa	30μg	-	-
Colistin	K Showa	5μg	+	+
Sulfisoxazole	i Showa	400μg	-	-
Spiramycin	Ss Showa	30μg	-	-
Lincomycin	Li Showa	30μg	-	-
Dihydroxymethyl furanthridine	fs Showa	20μg	+	+

a) +, ++, +++: sensitive, -: resistant.

5°C下における消長を、再現実験しその結果を Fig. 3 に示した。

25°Cにおいては、pH4.1にもかかわらず、急速な増殖をみ、24hr後 *S. nagoya* は、 $1.7 \times 10^5/g$ 、*K. oxytoca* は $1.9 \times 10^6/g$ に達した。

5°C では、両菌とも、6日経過後も死滅することなく生残し、初期添加菌量を保持した。

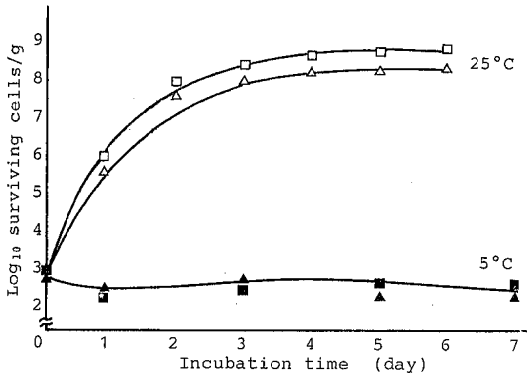


Fig. 3. Survival of *S. nagoya* and *K. oxytoca* in tartar sauce. (*S. nagoya*: 5°C ▲, 25°C △; *K. oxytoca*: 5°C ■, 25°C □).

食中毒原因菌の食品中での生残性に関する因子としては、pH、水分活性、食塩濃度、時間等が考えられるが、斎藤ら〔21〕は、サラダや種々の pH 条件下の実験において、30°Cでは *Salmonella* は、pH4.0で6時間で死滅し、pH4.25では、24時間後から増殖傾向を示したと報告している。

8. *Klebsiella oxytoca* の毒性産生性

乳のみマウス投与試験結果では、腸管貯留重量は、平均 $0.14 \pm 0.04g$ で、対体重量比0.052で陰性を示した。また V-ET RPLA 試験も陰性を示し、コレラトキシンとの共通抗原を有する LT の産生は認められなかった。

考 察

1. 自験例と *Salmonella nagoya*

今回、原因菌として分離された *S. nagoya* は、1951年 Nakajima ら〔12〕により初めて分離報告されて以来、1960~1970年代は、比較的名古屋地方に局限して分布する傾向を示しながら、散發下痢症や集団食中毒として報告〔22, 23〕をみてきた。中村ら〔20〕の報告によれば、1938~1961年における名古屋地方での分離 *Salmonella* のなかで、*S. nagoya* は、全国の分離率0.7%に比して9.7%と高いと報告している。1980年代における分布実態は、感染症情報年報〔24, 25〕によれば、1980年

に全国で分離された *Salmonella* は、958事例で、その内 *S. nagoya* は23事例(2.4%)となっている。分離地域は、静岡、岐阜、神戸、大阪、千葉にわたっている。1981年においてもほぼ同様に、626事例中25事例(4.0%)が、大阪、静岡、千葉で分離報告されている。

一方、輸入肉の *Salmonella* 分布についての鈴木ら〔26〕の報告では、1965年~1968年分離された66血清型の中には、*S. nagoya* は含まれておらず、その後の報告〔27, 28〕にもみられない。

S. nagoya による集団食中毒事例は、1962年に山田ら〔24〕は愛知県で、その後1970年の篠川ら〔29〕、高橋ら〔30〕の報告で、2事例の発生報告がみられている程度である。

なお、広島県における *S. nagoya* の分布は、著者らの1960年~1970年の都市下水等の環境調査からは分離されなかったが、1974年に至って中森ら〔31〕、宮崎ら〔32, 33〕は散發性下痢症、都市下水から各々1例の分離報告を行っている。

S. nagoya の病原性についての坂崎ら〔34〕の報告では、犬における投与実験で *S. enteritidis*, *S. typhimurium* に比較し、排菌時間および同居犬への伝播力において、明らかに弱毒であったと報告している。しかし今回の発症率(59.3%)や臨床症状をみる限り、他の *Salmonella* 食中毒との差異は、*K. oxytoca* の関与も考えられるが認められない。

薬剤感受性については、落合〔35〕は1965年名古屋地方のヒト由来株5株が、また斎藤〔36〕は、1957年~1965年分離された菌株全だが、CP, SM, TCに感受性を示したとの報告がある。今回の分離株は、これらの報告と同一の感受性パターンを示したことから、1960年代まで名古屋地方に局限して分布していた *S. nagoya* は、1970年代以降、飼料、食肉等の流通機構を通じ、中部、近畿、関東、中国地方へと分布は拡大し、広島地方においても常在菌型になりつつあると考えられる。

2. 自験例と *Klebsiella oxytoca*

K. oxytoca は、分類学的には、広義の *K. pneumoniae* の1生物型〔5, 6〕とされているが、散發性下痢症から数多く分離をみ *K. oxytoca* として多くの報告〔4, 7-11〕がなされ、分類学的にも、病因論的にも多くの論議のある菌種である。しかし、本菌の関与した集団食中毒事例は、単独、混合を問わず未だ報告をみない。1979年スウェーデンの Danielsson〔37〕は、生物型性状は明らかではないが、LT産生 *K. pneumoniae* による2例の集団食中毒事例を報告している。

K. oxytoca の分布については、市販食品について潮田ら [38] は、サラダ70%、サンドイッチ63%の *Klebsiella* の分離率をみ、その分離株170株中7%が *K. oxytoca* であったと報告している。同じく潮田らは健康人糞便調査で *Klebsiella* 14.2%の分離率をみ、その分離株160株中42株 (26.2%) が *K. oxytoca* であったと報告している。自然界の分布については、1972年 Duncan ら [39] は、森林、牧場から分離した *Klebsiella* 170株中28株 (16.5%) が Indole 陽性株であったと報告し、また1975年 Seidler ら [40] は、植物から31% (18/58) と高い分離率を報告している。1974年 Matsen [41] は原水から分離した *Klebsiella* 266株のうち4.4%が Indole 陽性株であったと報告している。さらに、1977年 Knittel [42] は、ジャガイモ、レタス、パルプ等に広く分布する *Klebsiella* は、その表面で急速に増殖 ($10^3/g$) し人への感染源となりうると報告している。臨床材料では、1974年 Pennie [43, 44] は、病巣材料から分離した *Klebsiella* 640株中 Indole 陽性株は16%であったと報告し、1977年 Silva ら [45] は、尿、痰から分離した *Klebsiella* 295株中10%が Indole 陽性株であったと報告している。また院内感染症や opportunistic infection において *K. oxytoca* が大きなかわりを持ち、その相当部分が Indole 陽性株であるとの報告 [46, 47] もみられる。著者らも散発性下痢症をはじめ、ヒト、イヌ、カキから本菌の分離を試み、動物、ヒト、自然界に幅広く分布していることを認めている。本自験例の原因食「タルタルソース」は、多くの報告からみられるように、その原材料は、卵、非加熱野菜であり本菌による汚染、増殖は十分考えられる。

今回の分離 *K. oxytoca* の特徴的な生化学的性状は、Indole (+)、色素産生(+)、ゼラチン液化(+)、ペクチン分解(+)、 10°C 発育(+)、 44.5°C 発育(-)であった。Bagley ら [48] は、病原性 *K. pneumoniae* の85%が 44.5°C 発育(+と報告しているが、今回の分離株はいずれも発育をみなかった。しかし生化学的性状による分類では、坂崎 [4] の報告する *K. oxytoca* の生物型1に、また Naemura [49] の分類Ⅳ、Pease [50] の分類3型にそれぞれ属するものと考えられる。

薬剤感受性は、PC、ABPC、ACPC、AMPC、CBPC、SBPCに耐性を示し、多くの報告にある広域抗生剤投与後に発生する特異な下痢症から分離される菌株の示す感受性と一致をみた。

血清型別については、いずれも荚膜型 K-19 であり、坂崎 [4]、瀬尾 [8] の報告と一致し、また1978年 Ca-

sewell [51] の患者便695例より分離した *Klebsiella* 904株について、K-47、K-21、K-19 が最も多かったとの報告とも一致をみている。

K. oxytoca の病原性については、坂崎ら [4, 6] は、L細胞でC P陽性、ddYマウスループ試験陽性を認めたが、培養液ではいずれも陰性であると述べている。

K. oxytoca の腸管毒については、この報告はみられず、Klipstein [52, 53] は *K. pneumoniae* の K-5 菌株においてS Tを証明しているのみで、今日 *K. oxytoca* の一次的腸炎起病性の有無を含め、その病因論は未知の部分が多い。

現在著者らは、種々の条件下で各種細胞レベル、個体レベルでの病原性の究明と、下痢症からの分離調査を継続中であるが、最終的な結論は、今後の研究に待つとしても、*K. oxytoca* の病因論としては、1) 菌交代症による特定菌の異常増殖あるいは細菌叢バランスの破綻 [8]、2) 抗生剤そのものあるいは、その代謝産物の腸管壁への直接作用、3) 宿主側の抗生剤に対する過敏症、4) 混合摂食 (感染) による毒力増強 [54-56]、5) その他等が報告、あるいは推察されている。1) については、多くの散発事例で一致をみるが、明らかに薬剤投与を受けない事例での発生もあることから全てこれが原因とするには無理がある。また2)、3) についても確証した報告はみられない。4) については、1981年大野ら [54] は、ハムスターを用いた *Clostridium difficile* と *K. oxytoca* の病原性実験において、両者の相互作用の存在を報告し、また藤原ら [55] は、病原微生物の混合汚染やヒスタミン投与が病原性増強を示すとの報告をしている。本実験における *K. oxytoca* の一次的腸炎起病性については、確認するにいたらないが、*S. nagoya* との混合汚染、同時摂取が、*S. nagoya* の病原性増強に何んらか関与し、特異な症状を呈したものと推定している。

3. 自験例における疫学的、食品細菌学的考察

本自験例の疫学的特徴は、潜伏時間が長く、発症ピークが複相性を示した点で通常の *Salmonella* 食中毒と趣を異にしている。

タルタルソース中での両菌の消長は、死滅することなく、室温では急速に増殖することが確認された。本例においては、調理→摂取の経過時間は、わずか50-60分であり、調理後の増殖は考えられないので、原因食の食品細菌学的品質が著しく低かったことから、タルタルソースの原料である野菜、卵および調理器具のいずれかが調理前から両菌に相当量汚染され、調理雑ぜ合せの時点では、すでにかかりの菌量の汚染があったものと考えら

れる。タルタルソース中の原因菌数の定量及び生残性実験の結果から1人当り(80g)摂取菌量は、*S. nagoya* 6.3×10^4 /人、*K. oxytoca* 19.2×10^4 /人と推定される。一般に *Salmonella* 食中毒の成人での50%発症必要菌量は、成書によれば、 10^{6-7} と報告されており、このことからみれば、本事例では 6.3×10^4 と少なく、潜伏時間の延長につながったものと考えられる。また *Klebsiella* の摂取菌量については、Danielsson [37] の、 5×10^4 /gを含むローストビーフおよび 100×10^4 /gを含むマッシュサラダの摂取により発症したとの報告がある。これらのことから、本事例は、*S. nagoya* と同時に、約 20×10^4 /人の *K. oxytoca* の摂取による両菌に起因した特異な食中毒事例であったと思われる。

要 約

1) 1982年6月1日～5日にかけて、広島県北部の幼稚園、小学校において患者数273名という *S. nagoya* と *K. oxytoca* の混合汚染によると思われる集団食中毒が発生した。主要症状は、腹痛(91.9%)、下痢(66.3%)、頭痛(41.4%)、発熱(33.2%)、嘔吐(12.5%)、嘔気(12.5%)等で、平均潜伏時間は41.3時間であるが、複相性の発症ピークを認めた。

2) 細菌学的検査結果では、被検患者18名の全員より *S. nagoya* が分離され、15名(85%)から *K. oxytoca* が分離された。原因食タルタルソースからは、*S. nagoya* 790/g、*K. oxytoca* 2,400/gが検出された。*Salmonella* の分離株は、粘液酸利用(-)以外定形的な *Salmonella* の生化学的性状を示したが、*K. oxytoca* は、Indole (+)、T S I 培地での色素産生(+)、ペクチン酸溶解(+)、 10°C 発育(+)、 44.5°C 発育(-)の特異な性状を示した。*K. oxytoca* の腸管毒素産生性は、乳のみマウス試験、コレラ抗毒素によるRPLA試験は陰性であった。

3) 薬剤感受性については、両菌は、Ol, Sp, E, Liに耐性を示し、Ka, C, T, Sに感受性を示した。また *K. oxytoca* はPC, ABPC, ACPC, AMPC, CBPC, SBPCには耐性を示した。

4) 再現実験による原因食タルタルソース中(pH4.1)での両菌の態度は、 25°C で急速に増殖を示し、また 5°C 6日間では死滅せず生残した。

以上の疫学的調査結果や細菌学的試験結果から、従来抗生剤投与後の散発性下痢患者から分離報告されてきた *K. oxytoca* が、本事例においては抗生剤投与に関係なく、原因菌である *Salmonella* と同時に、相当菌量、しかも高率に分離されたことから、何んらかこれが腸炎発

症に關与したものと考えられ、特異な集団食中毒事例として報告する。

終わりに、本調査に際し、試料の採取、疫学調査に御協力を頂いた可部保健所の環境衛生課、試験検査室の各位に深謝いたします。

なお本論文の主旨は、昭和57年度日本獣医公衆衛生学会(中国)で発表した。

文 献

- [1] 厚生省環境衛生局(1982)：ナグビブリオ、カンピロバクター等の食品衛生上の取扱いについて。厚生省通牒、環食第59号(昭和57年3月11日)
- [2] 坂崎利一(1982)：新しい食中毒菌とこれら細菌性食中毒の調べ方。食品衛生研究, 32, 547—556
- [3] 三輪谷俊夫(1983)：細菌性食中毒。臨床検査, 27, 600—640
- [4] 昭和50年食品衛生調査研究班(1975)：原因不明食中毒の研究。昭和50年食品衛生調査研究委託事業報告書, 9—30
- [5] 坂崎利一(1978)：*Klebsiella oxytoca* について。臨床と細菌, 5, 261—262
- [6] 坂崎利一, 田村和満(1979)：注目されている細菌。臨床病理, 特集37, 26—35
- [7] 西山好三郎, 神永陽一郎, 鈴木 充(1978)：下症患者から分離されたインドール陽性 *Klebsiella* 菌株(生物型 *Klebsiella oxytoca*) について。衛生検査, 27, 834—836
- [8] 瀬尾威久, 松原義雄(1979)：*Klebsiella oxytoca* と出血性下痢症。小児科, 20, 267—273
- [9] 戸田徹造(1978)：*Klebsiella oxytoca* による急性出血性腸炎。日本臨床, 36(春季増刊号), 1308—1309
- [10] 齊藤誠, 今川八東, 村田三紗子(1978)：*Klebsiella oxytoca* を検出する下痢症。臨床と細菌, 5, 270—276
- [11] 藤上良寛, 室木邦生, 松嶺賀恵, 池田美佐子, 松島照雄(1980)：*Klebsiella oxytoca* による偽膜性大腸炎の一例。広島県立病院医誌, 12, 139—142
- [12] Nakajima, K., Naito, S., Nakaya, R. and Fukumi, H. (1953)：A new *Salmonella* type: *Salmonella nagoya*. Japan. J. Med. Sic. Biol., 6, 179—182
- [13] 厚生省環境衛生局(1973)：食品衛生検査指針 I, 日本食品衛生協会, 東京

- [14] Edwards, P.R. and Ewing, W.H. (1955) : Identification of Enterobacteriaceae. Burgess, Minneapolis
- [15] 五島瑳智子 (1979) : 抗菌薬感受性測定法の問題点. 臨床病理, 37, 113—128
- [16] Giannella, R.A. (1976) : Suckling mouse model for detection of heatstable *Escherichia coli* enterotoxin. Infect. Immun., 14, 95—99
- [17] Evans, D.G., Evans, D.J. Jr. and Gorbach, S.L. (1973) : Identification of enterotoxigenic *Escherichia coli* and serum antitoxin activity by the vascular permeability factor assay. Infect. Immun., 8, 731—735
- [18] 坂崎利一 (1975) : 腸内細菌 (II), 各論 1, *Salmonella* 属. p. 32, 近代出版, 東京
- [19] 中村竜夫, 岡田一三, 川口とみ子, 内田汎美, 高野悦生, 永井 守, 木村幹夫, 坂崎利一 (1963) : 名古屋市内で捕獲された犬の *Salmonella* の検索成績について. 名古屋市衛研所報, 10, 11—14
- [20] 中村龍夫, 川口とみ子, 小沢英夫, 山内喜博 (1970) : サルモネラの薬剤耐性の動向. 名古屋市衛研所報, 17, 17—19
- [21] 斉藤香彦, 伊藤 武, 柳川義勢, 丸山 務, 坂井千三 (1980) : 市販食品中におけるサルモネラの増殖態度. 東京都衛研年報, 31(1), 103—108
- [22] 澤田 収 (1956) : *Salmonella nagoya* による急性胃腸炎. 日伝染会誌, 29, 557—562
- [23] 山田不二造, 安川史郎, 船橋 満, 樋江井博子, 太田秀夫 (1962) : 第 8 回東海公衆衛生学会
- [24] 微生物検査情報のシステム化に関する研究班 (1980) : 病原微生物検出情報年報, 130—144
- [25] 微生物検査情報のシステム化に関する研究班 (1981) : 病原微生物検出情報年報, 74—89
- [26] 鈴木 昭 (1969) : 第67回日本獣医学会公衆衛生分科会シンポジウム
- [27] 鈴木 昭, 河西 勉, 小沼博隆, 高山澄江 (1973) : 輸入家禽肉のサルモネラ検査成績. 国立衛生試験所報告, 91, 88—93
- [28] 河西 勉, 鈴木 昭, 小沼博隆 (1982) : 輸入食肉由来サルモネラの抗生物質感受性. 国立衛生試験所報告, 100, 200—203
- [29] 篠川 至 (1972) : 第46回日本伝染病学会シンポジウム
- [30] 高橋正樹, 伊藤武, 斉藤香彦, 坂井千三 (1982) : 1967年から1981年に食中毒事例, 散発下痢症患者および健康者から検出されたサルモネラの血清型とその推移. 東京都衛研年報, 33, 1—8
- [31] 中森純三, 西尾隆昌 (1975) : 都市下水系における *Salmonella* の汚染実態. 広島県衛研研究報告, 22, 22—25
- [32] 宮崎佳都夫, 中森純三, 西尾隆昌 (1982) : *Salmonella* の生態学的研究. 広島県衛研研究報告, 29, 1—15
- [33] 広島県臨床細菌研究会 (1983) : 広島地方のサルモネラ症. 臨床と細菌, 10, 227—235
- [34] 坂崎利一 (1967) : 第14回日本伝染病学会シンポジウム「サルモネラ症」
- [35] 落合国太郎, 内藤晶之助 (1968) : 昭和40年名古屋地方における *Salmonella* 菌族とその薬剤耐性. 日伝染会誌, 41, 371—373
- [36] 斉藤 誠 (1966) : 抗生物質感受性の年次的推移. 医学のあゆみ, 56, 342—346
- [37] Danielsson, M.L., Möllby, R., Brag, H., Hansson, N., Jonsson, P., Olsson, E. and Wadstrom, T. (1979) : Enterotoxigenic enteric bacteria in foods and outbreaks of food-borne diseases in Sweden. J. Hyg., Camb., 83, 33—39
- [38] 潮田 弘, 新垣正夫, 寺山 武, 五嵐英夫, 坂井千三 (1978) : 市販食品からの *Klebsiella* の検出ならびに食品および健康人ふん便由来株の種と生物型の比較. 東京都衛研年報, 29, 163—166
- [39] Dancan, D.W. and Razzell, W.E. (1972) : *Klebsiella* biotypes among coliforms isolated from forest environments and farm produce. Appl. Microbiol., 24, 933—938
- [40] Seidler, R.J., Knittel, M.D. and Brown, C. (1975) : Potential pathogens in the environment : Cultural reactions and nucleic acid studies on *Klebsiella pneumoniae* from clinical and environmental sources. Appl. Microbiol., 29, 819—825
- [41] Matsen, J.M., Spindler, J.A. and Blosser, R.O. (1974) : Characterization of *Klebsiella* isolates from natural receiving waters and comparison with human isolates. Appl. Microbiol., 28, 672—678
- [42] Kinittle, M.D., Seidler, R.J., Eby, C. and Cabe, L.M. (1977) : Colonization of the botanical environment by *Klebsiella* isolates of pa-

- thogenic origin. *Appl. Environ. Microbiol.*, **34**, 557—563
- [43] Rennie, R.P. and Duncan, I.B.R. (1974): Combined biochemical and serological typing of clinical isolates of *Klebsiella*. *Appl. Microbiol.*, **28**, 534—539
- [44] Rennie, R.P., Nord, C. E., Sjoberg, L. and Duncan, I.B.R. (1978): Comparison of bacteriophage typing, serotyping and biotyping as acids in epidemiological surveillance of *Klebsiella* infection. *J. Clin. Microbiol.*, **8**, 638—642
- [45] De Silva, M.I. and Rubin, S.J. (1977): Multiple biotypes of *Klebsiella pneumoniae* in single clinical specimens. *J. Clin. Microbiol.*, **5**, 62—65
- [46] Haverkorn, M.L. and Michel, M.F. (1979): Nosocomial klebsiellas. I. Colonization of hospitalized patients. *J. Hyg., Camb.*, **82**, 177—193
- [47] 猿渡勝彦 (1979): 日和見感染をめぐって. *臨床病理*, XXVII (2), 112—120
- [48] Bagley, S.T. and Seidler, R.J. (1977): Significance of fecal coliform-positive *Klebsiella*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **33**, 1141—1148
- [49] Naemura, L.G. and Seidler, R.J. (1978): Significance of low-temperature growth associated with the fecal coliform response, indole production and pectin liquefaction in *Klebsiella*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **35**, 392—396
- [50] Pease, P.E., Tyler, R.A., England, J.R., Colthorpe, D. and Ebringer, A. (1982): An investigation in to the properties of *Klebsiella* strains isolated from ankylosing spondylitis patients. *J. Hyg., Camb.*, **89**, 119—123
- [51] Casewell, M.W. and Phillips, I. (1978): Epidemiological patterns of *Klebsiella* colonization and infection in an intensive care ward. *J. Hyg., Camb.*, **80**, 295—301
- [52] Klipstein F.A. and Engert, R.F. (1975): Enterotoxigenic intestinal bacteria in tropical sprue. III. Preliminary characterization of *Klebsiella pneumoniae* enterotoxin. *J. Infect. Dis.*, **132**, 200—203
- [53] Klipstein, F.A. and Engert, R.F. (1976): Purification and properties of *Klebsiella pneumoniae* heat-stable enterotoxin. *Infect. Immun.*, **13**, 373—381
- [54] 大野義明, 佐々木勇三, 岡田 淳, 桜井幸弘, 多賀須幸男 (1981): ハムスターを用いた実験的出血性大腸炎の検討. *臨床病理*, **29**, 151
- [55] 藤原喜久夫, 三沢章吾, 土屋 滋, 小池和子, 三輪谷俊夫, 竹田美文, 坂口玄二, 久我哲郎, 飯田広夫 (1980): 病原微生物の混合汚染による病原性増強に関する研究. *食品衛生研究*, **30**, 919—922
- [56] Wells, J.G., Davis, B.R., Wachsmuth, I.K., Riley, L.W., Remis, R.S., Sokolow, and Morris, G.K. (1983): Laboratory investigation of hemorrhagic colitis outbreaks associated with a rare *Escherichia coli* serotype. *J. Clin. Microbiol.*, **18**, 512—520

粉チーズ中に混入された粉石鹼の 脂肪酸組成比による同定

穂 下 誠 彦*

Confirmation of Soap Mixed in Cheese by Comparison of Their Fatty Acid Composition

NOBUHIKO HOSHITA

(Received September 29, 1984)

はじめに

昭和58年7月市内の某小学校で、給食後数人の生徒が下痢を起し、調査したところ原因は給食時に使用した粉チーズに混入された石鹼臭のある異物であると思われるので、この異物が石鹼であるか否を調査してほしい、との分析依頼があった。なお、混入されたと思われる粉石鹼は、給食器等の洗浄に使用されているもので、大豆油を原料として製造されたものである。

動植物油脂の識別は、天然油脂中の常成分のなかで炭化水素やステロール等を指標にして行うことも可能であるが、これらは含量が少なく、入手の困難な標準品が多々ある。これに対して同様に常成分の脂肪酸は、他の脂質に比べて含量も多く、栄養学的にも重要な成分でその存在比は詳細に調査され、動物性油脂と植物性油脂とで明らかな差異があることが知られている〔1—3〕。

異物混入チーズはその臭気より石鹼の混入は明らかであったが、他の油脂類の混入の有無およびどの程度混入されたのかを明らかにするため、試料中の脂肪酸をガスクロマトグラフィーにより分析を行い次のような結果が得られた。粉チーズは乳脂と〔4〕、又、粉石鹼は大豆油と〔5, 6〕殆んど同じ脂肪酸組成比を示し両者に明らかな差異があり、他の油脂類の添加は認められなかった。又、異物混入チーズの脂肪酸は粉チーズと粉石鹼を15:85の割合で混合した場合と同じ組成比を示した。

実験方法

試料1gにエタノール性KOH(1N)20mlを加え2時

間煮沸し放冷後水20mlを加えエーテル20mlで中性物質を除き、水層を塩酸性としエーテル(20ml×2)で脂肪酸を抽出した。このエーテル層は、水洗、芒硝による乾燥、減圧濃縮し、ジアゾメタンによりメチルエステルとした後ガスクロマトグラフィー(GLC)により分析を行った。GLC(FID)による分析は次のような条件で行った；装置はYanaco Model 2800を使用し、カラムはUnisole 3000(60-80 mesh, i.d. 3mm×3m)、カラム温度220°C、窒素ガス流量30ml/min。

実験結果及び考察

試料をアルカリ加水分解し、脂肪酸を抽出した後、メチルエステルとしてGLCによる分析を行った結果を表1に示した。

粉チーズはパルミチン酸が主成分(32.1%)で飽和脂肪酸含量が多くその合計は77.3%であった。又、不飽和脂肪酸の大部分はオレイン酸(20%)でリノール酸とリノレン酸含量は非常に少量であった。この結果は牛乳脂の脂肪酸組成と非常に類似した値で〔4〕、添加物等を含んでいないことを示唆している。一方、粉石鹼中の脂肪酸は、粉チーズの場合とは逆に飽和脂肪酸含量は少なく、不飽和脂肪酸中の大部分がリノール酸(58.2%)であった。又、粉チーズ中に存在したラウリン酸とミリスチン酸は検出されなかった。この結果はリノレン酸含量が若干少ないことを除けば、大豆油中の脂肪酸組成比と殆んど同じであった〔5, 6〕。この粉石鹼は大豆油のみを原料とし製品であるとの表示がありこれを裏付ける結果であった。異物混入チーズ中の脂肪酸の主成分は、粉

* 広島県衛生研究所：Hiroshima Prefectural Institute of Public Health.

表1. 試料中の脂肪酸組成比(%)

脂 肪 酸	異物混入 粉チーズ	粉チーズ	粉 チ ーズ : 粉 石 鹸			粉 石 鹸
			(90 : 10)	(50 : 50)	(15 : 85)	
ラウリン酸	1.5	12.2	10.7	5.4	1.2	—
ミリスチン酸	2.3	25.2	18.8	8.6	1.7	—
パルミチン酸	16.9	32.1	27.8	17.6	16.1	12.1
ステアリン酸	1.7	7.5	6.3	3.0	2.4	2.4
オレイン酸	20.2	20.2	17.3	16.9	17.4	22.6
リノール酸	49.2	1.3	15.7	41.4	52.8	58.2
リノレン酸	8.2	1.4	3.4	7.1	8.4	4.7

チーズ中では非常に少量であったリノール酸(49.2%)で、粉チーズとは逆に不飽和脂肪酸含量が多く、粉石鹸中には見られなかったラウリン酸とミリスチン酸が共に約2%と少量であったが検出された。又、この2種の飽和脂肪酸を除いた他の5種の脂肪酸組成比は粉石鹸のそれに近い値であった。以上の結果は、粉チーズ中に多量の粉石鹸が混入されていることを示している。

粉チーズと粉石鹸の混合割合を知るため表に示したように、粉チーズと粉石鹸の割合を90:10, 50:50, 15:85に混合し、これらの脂肪酸含量の分析を行った。粉チーズに加えた粉石鹸の増加量と共に飽和脂肪酸量は減少し、特にラウリン酸とミリスチン酸は粉石鹸を85%とした時1/10以下に減少した。又、リノール酸とリノレン酸は逆に、粉石鹸量の増加と共に組成比は増し、特にリノール酸は粉石鹸中の数値に近い値を示した。更に7種の脂肪酸個々を比較すると、ここに示した3種の混合物のうち粉チーズ:粉石鹸=15:85の脂肪酸組成比は異物混入チーズのそれと非常に近い値を示した。又、粉チーズと粉石鹸とで含量に大きな差のあるリノール酸とミリスチン酸の増加並びに減少曲線より(図1)、異物混入チーズ中の粉石鹸の量は約80%であった。

以上のように脂肪酸組成比のみより明確な結論が得られたのは、動物油脂と植物油脂という異種の油脂の混合試料であったことによるものである。同種の油脂の識別をその脂肪酸分析のみより行うことは殆んど不可能で、例えば炭化水素やステロール等他の脂質〔7, 8〕との組合せによらなければならないであろう。しかしながら、ここに試みた方法は、斯かる事例に対する一指針として十分有用な方法であると思われる。

文 献

〔1〕 進藤信一, 平野三郎: 新版脂肪酸化学, 稲葉恵一, 平野三郎編, p.2 (1981) 幸書房.

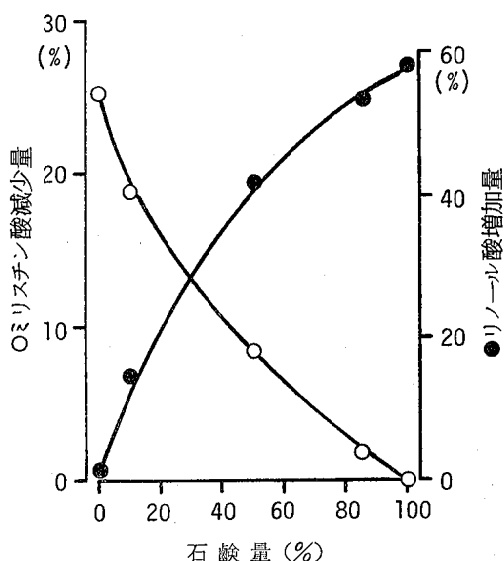


図1. 粉チーズに加えた粉石鹸量に対するリノール酸増加量及びミリスチン酸減少量。

〔2〕 科学技術庁資源調査会編: 日本食品成分表(三訂補), p.196 (1981) 医歯薬出版.
 〔3〕 日本油脂化学協会編, 油脂化学便覧, p.26(1958) 丸善.
 〔4〕 ガスクロデータ小委員会: 油化学, 27, 814(1978).
 〔5〕 小林雅美, 福島潤子, 野口 駿: 家政学雑誌, 25, 32 (1974).
 〔6〕 ガスクロデータ小委員会: 油化学, 27, 886(1978).
 〔7〕 舟橋三郎, 原一郎, 山川民夫編: 脂質 I, (1970) 共立出版.
 〔8〕 Chemistry and Biochemistry of Natural Waxes: ed. by P.E. Kolattukudy (1976), Elsevier, Amsterdam.

醤油中の安息香酸の分析

松尾 健* 頼光 彰子** 金廣 美智子**
金森 久幸* 坂本 征則*

Analysis of Benzoic Acid in Soy Sauce

TAKESHI MATSUI*, AKIKO YORIMITSU**, MICHIKO KANEHIRO**,
HISAYUKI KANAMORI* AND IKUNORI SAKAMOTO*

(Received Oct. 11, 1984)

はじめに

安息香酸(BA)の分析は、従来「食品中の添加物分析法」〔1〕により、水蒸気蒸留、溶媒抽出のち、ガスクロマトグラフィー(GC)を行うこと(以下(1)法)によってなされていたが、昭和56年に「食品中の食品添加物分析法」〔2〕が示され、これに収載されている方法(以下(2)法)が、溶媒による直接抽出のちGCによる定量という、より簡便なため最近では専らこの方法による。

今回、著者らは醤油中のBAの定量分析を行っていたところ、(2)法ではわずかであるが使用基準を超える値を示すが、(1)法では基準値以下の値を示す検体に遭遇した。この原因を追求したところ、(1)(2)法による定量値の相異は検体中に存在したレブリン酸(LA)によるものであること、また、このLAは水蒸気蒸留によって除去できることを明らかにした。さらに、定量分析に影響をおよぼすLAの薄層クロマトグラフィー(TLC)による簡便な確認方法を確立したので報告する。

実験方法

1 GCによる定量

1) 標準溶液の調製

BAをアセトンに溶かし1 mg/mlの濃度の標準原液を作る。この原液1~9 mlを取り、内部標準としてアントラセン溶液(4 mg/ml) 1 mlを加え、アセトンで10 mlとした。これを5% DEGS+1% H₃PO₄ カラムを用いる時の

標準溶液とした。また、1~9 mlの原液に内部標準としてn-オクタデカン溶液(1 mg/ml) 1 mlを加え、アセトンで10 mlとし、これを10% NPGS+1% H₃PO₄ カラムを用いる時の標準溶液とした。

2) 試料溶液の調製

醤油20 gを(1)及び(2)法に従って処理し、以下標準溶液と同様に内部標準溶液を加えて試料溶液とした。

3) GC条件

装置：島津製作所製 6AM型(FID)。カラム：①5% DEGS+1% H₃PO₄ on Chromosorb W AW 60~80 (3mm φ × 2m)、②10% NPGS+1% H₃PO₄ on Chromosorb W (AW DMCS) 60~80 (3mm φ × 2m)。カラム温度：200°C。注入口、検出器温度：230°C。キャリアーガス：N₂。流速：①60 ml/min、②50 ml/min、注入量：5 μl。

4) 定量操作

内部標準法を用い常法に従って行った。

2 BA添加回収実験

BAを含まない醤油20 gにBA 4 mgを添加する。これを(1)及び(2)法により処理し、前述定量操作に従って回収実験を行った。

3 LA添加回収実験

LAを含まない醤油20 gにLA 4 mgを添加する。これを(1)法により処理し、前述定量操作に従って回収実験を行った。

* 広島県衛生研究所：Hiroshima Prefectural Institute of Public Health.

** 広島県可部保健所：Hiroshima Prefectural Kabe Health Center.

4 ガスクロマトグラフィー—マススペクトロメトリ— (GC-MS) による同定

(1), (2)法による検液及びBA, LA標品について以下の条件でGC-MSを行った。

GC-MS条件; 装置: YANACO G-2800を連結した日本電子製 JMS D-300及び JMA-2000 データ処理システム. カラム; 2%DEGS+0.5% H_3PO_4 on Chromosorb W (AW DMCS) (3mm ϕ ×2m). カラム温度: 200°C. 注入口温度: 215°C. キャリアーガス: He. 流速 20ml/min. イオン源温度: 200°C. イオン化電圧: 70eV. イオン化電流: 300 μ A.

5 TLCによるBA, LAの定性

(2)法による検液と, BA, LA標品の 1 mg/ml アセトン溶液を倍数希釈したものをTLCに付した。

TLC条件; プレート: Kiesel gel 60F-254 (Merck). 展開溶媒: n-ヘキサン-酢酸エチル-ギ酸(10:10:0.5). スポット量: 2 μ l. 検出: BA-UV254nm, LA-ヨウ素

実験結果及び考察

1 GCによるBAの定量

醤油中のBAを分析する際に, 使用基準 (0.6 g/kg) を超える 0.62 g/kg の測定値を示す検体があった。これは, 最近繁用される(2)法に従って分析した値であるが, 以前行っていた(1)法によると測定値は 0.52 g/kg となった。この測定値の相異は, 回収率の差に起因するのではないかと考え, 両法の回収率について精査したところ, (1)法では90.8% (C.V. 1.0%), (2)法では95.9% (C.V. 1.3%) となり, これら二種の方法には若干の回収率の差は認められたものの, 上記測定値の相異に影響をおよぼす程の差ではなかった。

福井等は, 醤油中のBAのGC分析でカラムに 5% DEGS+1% H_3PO_4 を用いた場合LAを誤認定量することを報告している [3]。

今回も(1)及び(2)法いずれの場合においても, GCカラムは 5%DEGS+1% H_3PO_4 を使用することになっているため, 高い測定値を示す(2)法に従って調製した検液にはLAの存在が疑われた。そこでこの検液のBAに相当するピークについてGC-MSを行った。このピークのスペクトルを, 標品のBA, LAのスペクトルと共にFig. 1に示すが, BAのピークに重なってLAが共存することが確かめられた。

LAの存在が確認できたので, LAとBAの分離が可

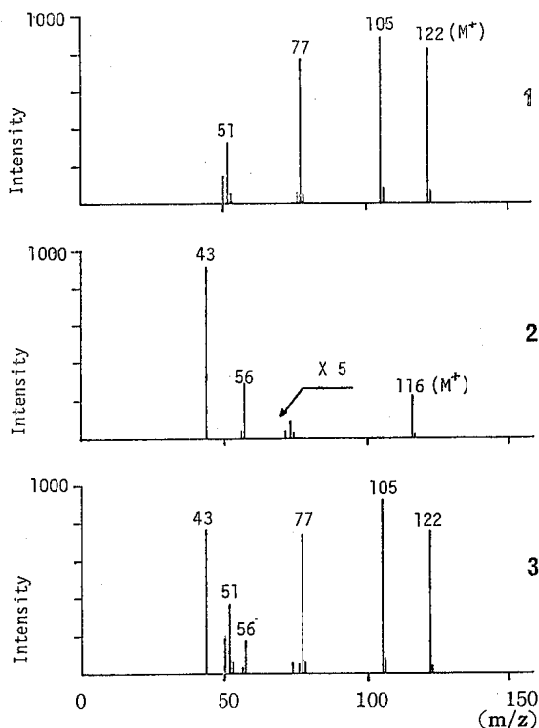


Fig. 1. Mass spectra of Benzoic acid (1), Levric Acid (2) and Ether Extract of Soy sauce (3).

Column: 2.5% DEGS+0.5% H_3PO_4 (i.d. 3mm×2m). Column temp.: 200°C. Inject temp.: 215°C. Carrier gas: He, 20ml/min. Ion source temp.: 200°C. Ionization volt.: 70eV. Ionization current: 300 μ A.

能なGCカラムの 10%NPGS+1% H_3PO_4 カラム [3] を用いて両者の分離と同時にBAの定量を行ったところ, Table I に示す様に 0.56 g/kgであった。

Table I. Determination of Benzoic Acid in Soy sauce

Methods	5%DEGS+1% H_3PO_4	10%NPGS+1% H_3PO_4
(I)	0.52	0.53
(II)	0.62	0.56

(g/kg)

同様に, (1)法による検液についてもGC及びGC-MSを行ったが, LAは全く検出されなかった。そこで, LAの水蒸気蒸留における挙動を調べるため, 水及び醤油でLAの添加回収実験を行ったところ, 留液にはLAは認められず, LAが水蒸気蒸留で留出しないことが明

らかになった。

我々の経験では、大豆、小麦、食塩を原料として製造される本醸造醤油からはLAを検出したことはないが、これらの原料に、味液としてアミノ酸液を加え製造される新式醸造醤油からは、すべてLAを検出している。従って、この様にLAが存在する場合のBAのGCによる分析には、GCカラムで両者を分離して分析するか、水蒸気蒸留による前処理でLAを除いておく必要がある。

2 TLCによるLA, BAの定性

BA, LAが共存する場合の定量分析については前項で述べたが、予めLAの定性をすることができれば後の

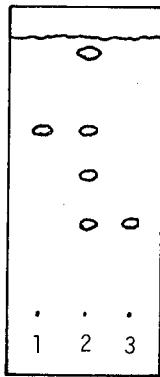


Fig. 2. Thin-Layer Chromatogram of Benzoic Acid (1), Ether Extract of Soy sauce (2) and Levric Acid (3).
Plate: Kiesel gel 60 F-254 (Merck). Solvent: n-Hexane : Ethyl Acetate : Formic Acid (10 : 10 : 0.5). Detection : Benzoic Acid-UV254nm, Levric Acid- I_2 .

定量操作が容易となるので、TLCによる簡便な両者の分離定性分析法を検討した。シリカゲルプレートを用い、n-ヘキサン：酢酸エチル：ギ酸(10：10：0.5)で展開した場合、Fig. 2に示す様に良好な分離が得られ、爽雑物の影響も見られなかった。なお、検出にはBAにUV 254nm, LAにヨウ素を用いたところ、それぞれ1スポット当り125ng, 500ngまで確認でき、本法は醤油中のBA, LAの定性分析に十分実用的であることが示された。

ま と め

1) LAが共存する醤油中のBAを分析する場合には、GCカラムを検討しLAとBAを分離して定量する必要があるが、(1)法の水蒸気蒸留による前処理を行えば、LAの妨害を除去できることがわかった。

2) BA, LAの定性法を検討し、プレートにシリカゲル、展開溶媒にn-ヘキサン：酢酸エチル：ギ酸(10：10：0.5)を用いたTLC法でLAとBAを分離し確認することができた。また、この方法で予めLAの定性を行えば後の定量操作が容易になる。

文 献

- [1] 厚生省環境衛生局食品化学課編：食品中の添加物分析法。第1集，1976，1。
- [2] 厚生省環境衛生局食品化学課編：食品中の食品添加物分析法。講談社，東京，1981，187。
- [3] 福井保夫，広島 薫：昭和57年度中国地区食品衛生監視員業績発表会鳥取県講演要旨集，広島，1982，25。

他誌掲載論文要約 (1983年11月～1984年10月)

中森純三, 宮崎佳都夫, 西尾隆昌: 市販調理ずみ食品における *Salmonella* の増殖. 日本公衆衛生雑誌, 30: 599-606, 1983.

近年, 夏期を中心として多発するサルモネラ症散発患者の発生要因を解析する疫学的研究の一環として, 大量に市販されている調理ずみ食品における *Salmonella* の動態を追究した.

患者からの分離頻度の高い *S. typhimurium*, *S. typhimurium* var. *copenhagen*, *S. java*, *S. infantis* および *S. litchfield* の各供試菌をコロケ, ハンバーグステーキ, 肉だんご, 鶏肉照り焼き, 牛肝バター焼きおよびだしまきにそれぞれ $10^4/g$ の菌密度に接種して 25°C に保存した場合, 24時間後には $10^4/g \sim >10^8/g$ の菌密度に達した. しかし 10°C と 5°C では静菌状態にあった. これらの食品はいずれも pH 5.6~8.7, 食塩濃度 1.1~2.8%, 水分活性 (a_w) 0.97~0.99 の範囲にあって, 25°C では多くの場合, *Salmonella* は腐敗に先行してきわめて旺盛に増殖することが確認された. 卵サラダと牛肝つくだ煮では供試全菌株とも増殖は認められなかった. 前者では低い pH が, 後者では低い水分活性が主たる増殖阻止因子と考えられた. しかしこの両食品においても, 10°C と 5°C では3日後にも接種菌量は維持されていた. また家庭で使用されている木製マナ板は *Salmonella* の伝播役を演ずることが明らかにされた.

Kanamoto, Y., H. Kotani*, M. Ogata** and Y. Matsuo***: Isolation of *Mycoplasma* and *Ureaplasma* species from raccoon dogs (*Nyctereutes procyonoides viverrinus*). J. Gen. Microbiol., 129: 2447-2450, 1983.

ウレアプラズマ属は現在ヒト由来のものを *Ureaplasma urealyticum* と命名し1種, 14血清型が認められているが, その分布は広く各種動物からも分離されている. 各種動物由来のウレアプラズマとヒト由来のそれとの異同, 疾病との関係を明らかにするため野生動物由来のウレアプラズマの血清型について研究を行った.

野生のタヌキ5頭から分離されたウレアプラズマは, ヒト由来の14血清型のいずれとも交差が認められなかったが, イヌ由来のウレアプラズマとは血清型が一致した. またタヌキからはこのほか2種類のマイコプラズマも分離された.

* 動物繁殖研究所.

** 麻布大学獣医学部.

*** 広島大学医学部.

Mizuta, M. and H. Kanamori: Time-course of mutagenicity due to flavonols in a pickled vegetable. Mutation Res., 122: 287-291, 1983.

たかなの漬物に変異原活性が見い出されたので, 変異原物質の同定とその生成機序の解明のため, たかなの塩漬けの実験をおこなった. たかな漬の変異原物質は Sephadex LH20 カラムで分離精製後, HPLC による同定の結果, 主として flavonols の quercetin と kaempferol であった. これらは生材料では配糖体の形で含まれているため変異原性を示さないが, 漬物にすると配糖体が加水分解されて遊離の flavonols が生成することを経時的に示した.

Seno, M., S. Fukuda and H. Umisa: A teratogenicity study of phloxine B in ICR mice. Fd Chem. Toxic., 22: 55-60, 1984.

Jcl: ICR 妊娠マウスに, 混飼法により 1, 3, 5% 濃度の Phloxine B を妊娠6日~16日目に投与した. すべての投与群において体重増加が有意に減少した. 5%投与群では, 2例の母体死, 1例の死産, および母体肝重量の有意な増加があった. 全投与群において, 対照群に見られない頸椎弓分離が用量反応を伴って見出された. 全骨格異常は, 用量反応を示し, 3および5%投与群では有意に増加していた. 以上の如く Phloxine B は, 母体毒性を示す3%および5%濃度ではマウスに対して催奇形性を示した. この椎弓分離は1%投与群においても出現した.

Mochiike, A., I. Sakamoto and N. Hoshita: Synthesis of Octadecachloroquaterphenyls and the Ratio of Six Types of Polychlorinated Quaterphenyl Isomers in the Blood of "Yusho" Patients. Chem. Pharm. Bull., 31: 3994-4000, 1983.

カネミ油症の原因物質の一つとして, 大きな関心が寄せられている PCQ の毒性評価のためには, その構造をよく知ることが必要である. この一環として, 今回は油症原因油及び油症患者血液中の PCQ の骨格構造について検討した. すなわち, 考えられる6種類の骨格異性体

(完全塩素化クォーターフェニル)を合成し、これを用いてガスクロマトグラフィー及びマススペクトロメトリによる検討を行い、次のような結果を得た。

(1) 6種類の完全塩素化クォーターフェニルは、骨格の違いにより特徴的なマススペクトルを示した。

(2) 油症患者血液中のPCQは6種類の骨格異性体の混合物であることがわかった。

(3) 油症原因油と患者血液中のPCQではその骨格異性体比に差が認められた。

(4) 骨格の違いは、ヒトにおけるPCQの代謝速度に一つのファクターとして関与していることが予想される。

Hisayuki Kanamori, Naohide Kinae, Masaru Saito and Isao Tomita: Isolation and Identification of 1-Furyl- β -carboline Derivatives That are Mutagenic after Nitrite Treatment. Chem. Pharm. Bull., 32, 1980 (1984).

2-フルアルデヒドとL-トリプトファンを、0.1M リン酸緩衝液 (pH7.0)に溶解し、37°Cで4週間放置すると、褐変反応が起こる。反応溶液をpH4.0で亜硝酸処理を行うと、S. typhimurium TA 100に対して、S9無添加で変異原性を示すようになる。反応溶液をTLC、

HPLC等で精製し、2つの1-furyl- β -carboline誘導体を単離した。これらは、(1R, 3S)-1-(2-furyl)-1, 2, 3, 4-tetrahydro-9H-pyrido[3, 4-b] indole-3-carboxylic acidと(1S, 3S)-1-(2-furyl)-1, 2, 3, 4-tetrahydro-9H-pyrido[3, 4-b] indole-3-carboxylic acidであった。これらの化合物は、S. typhimurium TA 100に対して代謝活性化なしに亜硝酸処理すると変異原性を示した。

Hisayuki Kanamori, Ikunori Sakamoto, Mari Mizuta, Kazuhisa Hashimoto and Osamu Tanaka: Studies on the Mutagenicity of Swertiae Herba I.: Identification of the Mutagenic Components. Chem. Pharm. Bull., 32, 2290 (1984).

センブリ中の変異原物質として、7種のキサントン誘導体を単離した。そのうちの6種は既知物質であるmethylbellidifolin, methylswertianin, swertianin, bellidifolin, norswertianin, desmethylbellidifolinであった。7番目の変異原物質は、新しいキサントン誘導体であり、5, 8-dimethylbellidifolinと決定した。これらのキサントン誘導体は、S9 mix添加で、S. typhimurium TA 100に対して変異原性を示し、構造と活性の相関も認められた。

編 集 委 員 会

西 尾 隆 昌 (委 員 長)
宮 崎 佳 都 夫 (生 物 学 部)
水 田 満 里 (病 理 学 部)
穂 下 誠 彦 (理 化 学 部)
福 田 伸 治 (食 品 衛 生 部)
島 津 江 俊 弘 (総 務 部)

広島県衛生研究所研究報告

第 31 号

1984年12月発行

発行所 広島県衛生研究所
広島市南区字品神田1丁目5-70
〒734・電話(082)251-4371

印刷所 (株)柳盛社印刷所
広島市中区東白島町8-23
〒730・電話(082)221-2148