

Salmonella Montevideoが検出された食中毒事例について

A Case of Food poisoning Caused by *Salmonella* Montevideo

渡邊 節 菅原 直子 小林 妙子
山田 わか 齋藤 紀行 谷津 壽郎
廣重 憲生

Setsu WATANABE, Naoko SUGAWARA, Taeko KOBAYASHI
Waka YAMADA, Noriyuki SAITO, Juro YATSU
Norio HIROSHIGE

2005年8月に発生した介護老人保健施設の生野菜（カイワレ大根）を原因食品とする食中毒は、*Salmonella* Montevideoが原因菌であった。その後の関連調査により、同時期に発生した散発サルモネラ感染菌株および市販のカイワレ大根から同一血清型の菌が検出され、パルスフィールドゲル電気泳動法による遺伝子解析と薬剤感受性試験の結果これらが同一菌由来であることが判明した。一方、食品からの菌分離には増菌培地としてmECあるいはEEMを用いる分離方法が有効であると確認された。

キーワード：サルモネラ・モンテビデオ；カイワレ大根；パルスフィールドゲル電気泳動法；増菌培地

Keywords : *Salmonella* Montevideo ; Daikon sprouts ; Pulsed-Field Gel Electrophoresis ; Enrichment medium

1 はじめに

サルモネラ菌による食中毒は1999年をピークに減少傾向を示すが、現在でも発生件数、患者数ともわが国の細菌性食中毒の重要なものの一つである¹⁾。サルモネラは、ヒトや動物、河川、下水、土壌などの環境から分離され、畜産物、農産物にまで汚染が及んでいる。サルモネラ属菌は2300以上の血清型があるが、近年の食中毒事例では半数以上が*S. Enteritidis*によるもので、原因食品の多くは鶏卵、鶏肉や豚肉などの畜産食品およびその加工品である。しかし、諸外国ではこれらの食品の他、トマト、アルファルファ、メロンなどの生食用野菜や果物が原因食品となった食中毒の例が報告され²⁾、生食用野菜・果物のサルモネラ・リスクの対応が求められている状況である。

2005年8月、介護老人保健施設で生野菜を原因とする食中毒事例が発生し、患者、調理従事者、グリーンサラダとその食材のカイワレ大根から*S. Montevideo*が分離された。また、同時期に発生した散発サルモネラ感染者および市販のカイワレ大根からも同一血清型の菌が分離された。それぞれの菌株についてパルスフィールドゲル電気泳動（PFGE）法で遺伝子切断パターンの解析を行い、相同性について検討した。

また、今回の事例では、通常食中毒検査で用いているラパポート（RV）培地では食品からの菌分離が困難で

あった。そこで、本菌の食品からの検出率を高める目的で培地の検出比較を行ったので併せて報告する。

2 材料および方法

2.1 食中毒検査

介護老人保健施設で発生した食中毒の原因菌検査として、施設入所者61名、調理従事者11名、職員56名、計128名の便、食品29検体、拭き取り5検体、合計162検体の原因菌検査を赤痢、サルモネラ、病原大腸菌、カンピロバクター、腸炎ビブリオ、黄色ブドウ球菌、ウェルシュ菌、セレウス菌、エルシニアを対象として常法³⁾⁴⁾に従って実施した。さらに、サルモネラが検出されたグリーンサラダとカイワレ大根のサルモネラ菌量をMPN 5本法で求めた。

2.2 サルモネラ検出法の検討

市販カイワレ大根の可食部を無菌的に採り、等量のリン酸緩衝生理食塩水（PBS）を加え15秒間ストマッキングし2倍乳剤とした。BHIブイヨンで37℃ 1晩培養した*S. Montevideo*（食中毒由来株Sal-41）、*S. Enteritidis*（散発患者由来株Sal-94）の10⁸倍希釈液をカイワレ大根乳剤の10⁴倍希釈液10mlの中に1mlずつ添加混和し、ラパポート（RV）培地、ラパポートバシリアディス（RVS）培地、mEC培地、EEM培地、ハーナテトラチオン酸塩（TT）培地、緩衝ペプトン水（BPW）の入った各中試験

管10mlに1mlずつ接種した。

RVSは42°C20時間, RV, mEC, EEM, TT, BPWは37°Cで20時間培養し, DHL培地, SS培地, クロモアガーサルモネラ培地に1白金耳ずつ塗抹し24時間後の発育性を比較した。

2.3 市販カイワレ大根からのサルモネラ属菌検索と一般細菌数測定

2005年8月から9月にかけてカイワレ大根を量販店より22検体購入し, 1パックを1検体とし, 無菌的に可食部と根部分に分けて計量し, 等量のPBSを加えストマッキングし2倍, 10倍, 100倍希釈液を調製した。2倍乳剤はDHL, SS培地に直接塗抹しサルモネラ属菌検索を行った。さらにmEC10ml各5本に2倍乳剤2ml, 10倍希釈液を1ml, 100倍希釈液1mlずつ接種しMPN5本法でサルモネラ菌を定量した。また, 原液を段階希釈し標準平板菌数測定法による細菌数の測定を行った。

2.4 散発サルモネラ感染者由来菌株

2005年8月の1ヶ月間に宮城県医師会健康検診センターで散発下痢症患者から分離し, 当センターに分与されたサルモネラ属菌23株のH血清型別試験を市販血清(デンカ生研)を用いて実施した。

2.5 パルスフィールド・ゲル電気泳動(PFGE)解析

食中毒事件由来8株, 散発感染者由来2株, 市販カイワレ大根由来1株のS.Monteideo11菌株を寺嶋ら⁵⁾の方法に準じてPFGEを行った。すなわち, 各菌株のDNAを制限酵素Bln I およびXba I で切断後, パルスフィールド・ゲル電気泳動装置(BIO-RAD社CHEF Mapper)を用い5~50秒, 19時間の泳動条件で泳動した。

2.6 薬剤感受性試験

食中毒事件由来8株, 散発感染者由来2株および市販カイワレ大根由来1株, S.Monteideo11菌株のアンピシリン, ピペラシン, セファゾリン, セフォチアム, セフトジジム, セファクロル, フロムキセフ, セフポドキシム, アズトレオナム, イミピネム, メロペネム, ゲンタマイシン, アミカシン, ミノサイクリン, ホスホマイシン, スルファメトキシゾール, リメトプリム, レボフロキサシン17薬剤に対する感受性試験をドライプレートDP21(栄研化学)を用い微量液体希釈法で実施した。

3 結果

3.1 食中毒発生の概要

2005年8月19日, 介護老人保健施設から入所者96名中12名が18日0時から19日1時にかけて食中毒様症状を呈し, 内3名は入院した旨, 所轄の保健所に連絡があった。主な症状は下痢(12名:100%), 発熱(38.1~38.8°C10名:83.3%), 嘔吐(3名:25%)であった(表1)。共通食品は同施設で調理した食事であったことから, 施設の食事を原因食品とする食中毒と推定し, 疫学調査ならびに原因物質調査を実施した。調査のため, 入所者61名(発症者9名, 非発症者52名), 施設職員67名(調理従

事者11名, 介護従事者等56名), 8月15日から17日に提供した食品および食材29検体, 施設の調理場の拭き取り5検体, 合計162検体の微生物検査を行った。

検査の結果, 入所者24名, 調理従事者2名および16日夕食に提供したグリーンサラダとその食材のカイワレ大根からS.Monteideoが検出された。患者と食品から菌が分離され, 患者の症状がサルモネラ菌による症状と一致したことから, グリーンサラダ(カイワレ大根)を原因食品とする食中毒と断定された。

表1 食中毒の概要

発生年月日	平成17年8月18日
原因施設	介護老人保健施設 (施設内調理施設)
入所者	96名
発症者	12名
主な症状	下痢、発熱、嘔吐
原因食品	16日夕食 (カイワレ大根)
原因物質	<i>Salmonella</i> Monteideo

3.2 食中毒の原因物質調査

入所者61名, 調理従事者11名, 介護従事者等56名, 食品および食材29検体, 施設の調理場の拭き取り5検体, 合計162検体の微生物検査を行った結果, 入所者のうち発症者9名中8名, 非発症者52名中16名計24名, 調理従事者11名中2名の便および16日夕食に提供されたグリーンサラダとその食材のカイワレ大根からS.Monteideoが検出された。グリーンサラダはキュウリ, コーン, レタスおよびカイワレ大根をフレンチドレッシングで和えたものであった。介護従事者等からは菌が検出されなかった(表2)。なお, 菌が検出された調理従事者は味見としてグリーンサラダを喫食していた。

3.3 摂取菌量

食中毒事例でS.Monteideoが検出されたグリーンサラダおよびカイワレ大根のサルモネラ菌量をmECMPN5本法で求めた。グリーンサラダは6.6/g, カイワレ大根は960/gであった。当該施設の献立表から1人当たりのグリーンサラダは55gうちカイワレ大根は10gであったことから一人当たりの摂取菌量はMPN値で363~9600と推定された(表3)。

3.4 市販芽物野菜の検査

食中毒事例で使用されていたカイワレ大根は県外A業者の生産したものであった。そこで2005年8月から9月にかけて販売店からカイワレ大根22検体を購入し, 可食部と根部分に分けてサルモネラ属菌の検索および細菌数の測定を行った結果, 検体番号17の可食部と根部分からS.Monteideoが検出され, MPN値は可食部2.1/g, 根部分5.2/gであった。また, カイワレ大根の一般細菌数はすべて10⁶cfu/g以上で大半が10⁷~10⁸cfu/gと高い値であった(表4)。

3.5 散発サルモネラ感染者由来菌株

2005年8月の1ヶ月間に宮城県医師会健康センターで

受付されたサルモネラ属菌は23株あり、H血清型別試験の結果、8月6日および19日に同センターに検査依頼され菌検出された2株がS.Montevideoと同定された(表5)。

3.6 分離菌株のDNA解析

食中毒患者由来株として入所者由来4株(Sal-38, Sal-39, Sal-51, Sal-52: レーン1~4), 調理従事者由来2株(Sal-48, Sal-49: レーン5, 6), グリーンサラダ(Sal-41: レーン7) および食材のカイワレ大根(Sal-50: レーン8)を、市販カイワレ大根由来株として検体17の可食部(Sal-105: レーン9)と根部分(Sal-106: レーン10), 散発サルモネラ感染者由来株としてSal-73株(レーン11)とSal-98株(レーン12)のS.MontevideoについてPFGE解析をBln I, Xba Iの2種類の制限酵素を用いて行った。Bln Iの切断パターンを図1-Aに、Xba Iの切断パターンを図1-Bに示した。食中毒患者由来の8株と市販カイワレ大根2株および散発サルモネラ感染者Sal-98株はバンド切断パターンがすべて一致したが、散発サルモネラ感染者Sal-73株は600bp, 250bp領域付近にバンドが1本多く、680bp領域付近のバンドの消失が観察された。また、Xba IによるRFGE切断ではすべての菌株で切断パターンが一致した。このことから、食中毒患者由来株、市販カイワレ大根株および散発サルモネラ感染者株のSal-98は同一菌由来であることが判明した。また、散発サルモネラ感染者Sal-73は前述の菌株群と由来が近似していると思われる。

3.7 薬剤感受性

食中毒由来株、市販カイワレ大根由来株、散発サルモネラ感染者由来株について17薬剤に対する薬剤感受性試験を行った結果、すべての菌株はストマイ合剤に対し耐性を示したが、ほか16薬剤に対しては感受性を示した。

表2 食中毒におけるSalmonella Montevideo検出状況

検体の種類	便				食品	ふきとり
	入所者	施設職員	食品	ふきとり		
	発症者	非発症者	調理従事者	介護職員		
検体数	9	52	11	56	29	5
菌検出数	8	16	2	0	2	0

表3 食品中のSalmonella MPN値

食品	菌量 (MPN/g)	提供量 (g/人)	一人当たりの摂取菌量 (MPN)
グリーンサラダ	6.6	55	363
カイワレ大根	960	10	9600

表5 散発サルモネラ感染者菌株同定結果

検体	受付日	サルモネラの同定	検体	受付日	サルモネラの同定
1	8/1	Enteritidis	13	8/23	Istanbul
2	8/6	Montevideo	14	8/24	Istanbul
3	8/8	Potsdam	15	8/25	Braenderup
4	8/12	London	16	8/27	Istanbul
5	8/15	Typhimurium	17	8/27	Istanbul
6	8/15	London	18	8/29	Enteritidis
7	8/16	Typhimurium	19	8/30	Istanbul
8	8/18	Infantis	20	8/30	Istanbul
9	8/18	Agona	21	8/31	Istanbul
10	8/18	Bonn	22	8/31	Istanbul
11	8/19	Montevideo	23	8/31	Istanbul
12	8/22	Chomedey			

3.8 サルモネラ検出法の検討

RV, RVS, TT, mEC, EEM, BPWの6種類の増菌培地, SS, DHL, クロモアガーサルモネラの3種類の分離培地の組合せでサルモネラ検出を比較した。サルモネラの発育を3段階に分け、1~50個発育したものを「I」、51~100個発育したものを「II」、101個以上発育したものを「III」と表し、発育しなかったものを「0」

表4 市販カイワレ大根のサルモネラ属菌検索および一般細菌数

検体番号	購入日	可食部		根部分	検体番号	購入日	可食部		根部分
		一般細菌数 (cfu/g)	サルモネラ (MPN値/g)	サルモネラ (MPN値/g)			一般細菌数 (cfu/g)	サルモネラ (MPN値/g)	サルモネラ (MPN値/g)
1	8/30	>10 ⁶	—	—	12	9/10	1.8×10 ⁸	—	—
2	8/30	>10 ⁶	—	—	13	9/10	6.5×10 ⁸	—	—
3	8/30	>10 ⁶	—	—	14	9/12	1.9×10 ⁸	—	—
4	9/10	1.5×10 ⁸	—	—	15	9/12	4.2×10 ⁷	—	—
5	9/10	1.9×10 ⁸	—	—	16	9/12	3.2×10 ⁷	—	—
6	9/10	2.9×10 ⁸	—	—	17	9/12	5.4×10 ⁷	—	—
7	9/10	3.4×10 ⁷	—	—	18	9/12	1.7×10 ⁷	—	—
8	9/10	1.8×10 ⁷	—	—	19	9/12	1.4×10 ⁸	—	—
9	9/10	1.8×10 ⁸	—	—	20	9/12	2.0×10 ⁸	2.1	5.2
10	9/10	1.7×10 ⁸	—	—	21	9/12	2.3×10 ⁸	—	—
11	9/10	2.3×10 ⁸	—	—	22	9/12	2.3×10 ⁸	—	—

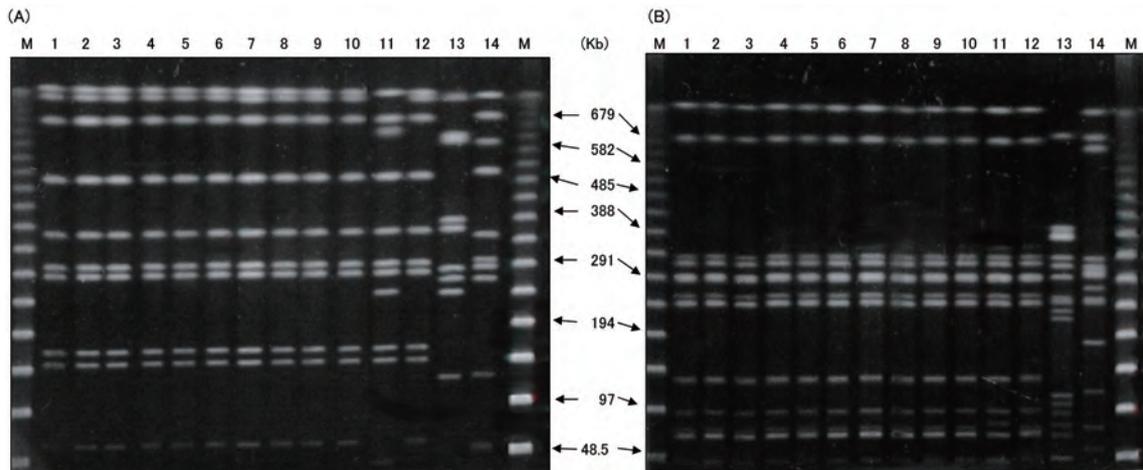


図1-A, 1-B レーン1~4: 食中毒患者由来*S. Montevideo*株, レーン5~6: 調理従事者由来*S. Montevideo*株, レーン7: グリーンサラダ由来*S. Montevideo*株, レーン8: カイワレ大根由来*S. Montevideo*株, レーン9~10: 市販カイワレ大根可食部由来*S. Montevideo*株および根部分由来*S. Montevideo*株, レーン11~12: 散発感染症患者由来*S. Montevideo*株, レーン13: 感染症患者由来*S. Bareilly*株, レーン14: 感染症患者由来*S. Enteritidis*株

とした。また、同時に発育した共雑菌を()内に概数で示した。その結果、サルモネラの検出は分離培地ではなく、増菌培地により差が現れた。SS培地上の菌の検出状況を表6に示した。選択性の強いRV, RVS, TTによる増菌培養では、共雑菌の発育が抑制され、サルモネラ菌以外の菌の検出はなかったが、分離されたサルモネラ菌数も少ない傾向を示した。選択性のないBPWは試料中の共雑菌の発育も促進するため、分離培地からの釣菌が困難であった。mECやEEMはBPWの場合ほど共雑菌は発育せず分離培地からの釣菌は容易であった。mECやEEMでの増菌が良好な結果を示した。これら培地には胆汁末が含まれ、これが芽胞菌や腸球菌を抑制し、BPWの場合ほど共雑菌は発育しないため分離培地からのサルモネラの釣菌は容易であった。これらを踏まえ、今回のサルモネラ属菌の検索やMPN値測定にはmECを用いた。

表6 各培地における*Salmonella*の発育状況

培地	菌種	<i>S. Montevideo</i>	<i>S. Enteritidis</i>
RV		I	0
RVS		II	I
TT		0	0
mEC		II (20)	III
EEM		I	III
BPW		II (20)	III (300)

0: 発育なし I: 1~50個 II: 51~100個

III: 101個以上 ()内は共雑菌発育数

4 考 察

わが国ではカイワレ大根, レタスサラダ, おかかサラダなどの野菜を含む食材により腸管出血性大腸菌O157食中毒が発生している⁶⁾。また、欧米でもレタスやメロ

ン, アップルジュースなど農産物を原因食品とするO157やサルモネラによる食中毒発生が知られている²⁾が、その汚染実態や感染経路は不明な点が多い。

今回の介護老人福祉施設の事例は、*S. Montevideo*に汚染されたカイワレ大根を摂取したことによる食中毒であった。食中毒患者や調理従事者、グリーンサラダとその食材のカイワレ大根から*S. Montevideo*が検出された。菌が検出された入所者はすべてグリーンサラダ(カイワレ大根)を喫食しており、調理従事者も味見のため喫食していた。患者の症状がサルモネラ菌による症状と一致したことから、グリーンサラダ(カイワレ大根)を原因食品とする食中毒と断定された貴重な事例であった。

当該カイワレ大根は県外のA業者が生産し販売している広域流通品で、施設では市場を介して購入していた。A業者のカイワレ大根を県内の量販店から購入しサルモネラ検索を行った結果、22検体中1検体から食中毒原因菌と同じ*S. Montevideo*が検出された。

食中毒事件での1人当たりのサルモネラ摂取菌量はMPN値363~9600であった。サルモネラ食中毒は通常 10^6 オーダー以上が発症菌量と言われているが³⁾、この事例では*S. Montevideo*は $10^2 \sim 10^3$ cfu/gの菌量であった。病院、療養所、老人養護施設、保育施設、小学校の学校給食などは一般社会と異なり基礎疾患あるいは年齢などの要因からサルモネラに対する感受性が高く、同菌による感染が発生しやすい環境にある。今回の事例でも対象者が高齢者グループであったことから、少ない菌量で発生したと考えられた。

また、カイワレ大根の微生物汚染を一般細菌数測定で計った結果、すべて1g当たり 10^6 オーダーであり、中には 10^8 オーダーに達したものもみられた。小沼は野菜の一般細菌数を調査し、野菜の多くが $10^3 \sim 10^7$ /gの細菌数を示し「弁当及びそうざいの衛生規範」⁷⁾の検体1g当

たり1,000,000以下というガイドラインを超えるものが30%、 10^7 /g以上のものが9%、*E.coli*汚染が1.3%の野菜にみらることを報告している⁸⁾。今回のカイワレ大根の調査では小沼の調査以上に一般細菌数が多く 10^7 /g以上のものは86%であった。*E.coli*検索は行っていないが、*E.coli*を病原性腸内細菌としてサルモネラ菌と同等に考えると、今回検出したサルモネラは検出率が4.5%でカイワレ大根が、一般的な露地野菜と比較しても高い微生物汚染があることが判明した。

同時期医師会健康センターから分与された散発サルモネラ感染者由来菌株23菌株中2株が*S.Montevideo*と同定され、今回検出された菌株はPFGE法による遺伝子解析等の結果、同一菌由来であることが推察された。

市販カイワレ大根から*S.Montevideo*が検出されたので、新たな感染のリスクが生じたことから県食品衛生行政担当課（食と暮らしの安全推進課）に直ちに報告した。県では食中毒の再発、拡大防止の観点から、集団給食施設における生野菜の衛生的な取扱いを関係者に通知し食中毒発生防止を図った。A業者を所轄する保健所のカイワレ大根栽培農場への立入検査では同菌による汚染は確認されず、散発感染症患者のカイワレ大根の摂取状況は不明であった。今回は行政と検査機関が連携をとって危害防止を行ったよい事例となった。

今回の介護老人保健施設の*S.Montevideo*食中毒はこれらのリスクが集積して発生した生野菜を原因とした特異な事例であった。

芽物野菜は、必要量を手頃な価格で利用でき通年供給されていることから近年需要が伸びている。自然界で栽培される野菜は土壌や水から微生物汚染があり、 10^6 ～ 10^8 /g程度細菌が検出される⁸⁾が、芽物野菜も同等以上に微生物汚染があり、さらにサルモネラによる汚染もあった。サラダや和え物等生で食べる機会が多い芽物野菜は薬剤による過度の滅菌消毒はできず、加熱し摂食す

る食品よりも食品衛生上のリスクが高いと言える。種子がいったん細菌汚染を受けると、栽培初期にはサルモネラ等の汚染菌量が少量でも食用に供するまでには相当な期間栽培することになり、菌の増殖を完全に抑制することはできないと推察される。生食を好む食文化をもつ我が国にとって、食品関係業者だけではなく消費者に対しても芽物野菜などの生食用野菜の長所と短所をよく啓発していくとともに、特に集団給食施設等では衛生的な取扱いが必要であることを周知していくことが重要であると思われた。

謝 辞

食中毒の調査を行った仙台保健福祉事務所塩釜総合支所ならびに菌株を分与していただいた宮城県医師会健康検診センターの関係各位に感謝いたします。

参考文献

- 1) 厚生労働省 (2004) “食中毒統計”
- 2) 金子賢一: 食品衛生学雑誌, 40, 418 (1999)
- 3) 坂崎利一編集 食水系感染症と細菌性食中毒 中央法規出版 P109 (2000)
- 4) 厚生労働省: 食品衛生検査指針微生物編 2004, 社団法人日本食品衛生協会, 2004
- 5) 寺嶋淳, 渡邊治雄, 中村明子: バルスフィールド・ゲル電気泳動法 *Salmonella Enteritidis*, 臨床と微生物, 23, No.6 (1996)
- 6) 甲斐明美: 腸管出血性大腸菌0157食中毒とその発生要因 日本食品微生物学会雑誌, 15, 91 (1998)
- 7) 厚生省環境衛生局食品衛生課長通知 “弁当およびそらぎいの衛生規範について” 平成7年10月12日, 衛食第188号, 衛乳第211号, 衛化第119号 (1995)
- 8) 小沼博隆: 市販カット野菜の微生物汚染状況 食品衛生研究, 45, 25 (1995)