

下水処理場流入水からのSTEC O157検出状況 (第1報)

石畝 史・宇都宮央子・中村 雅子・浅田 恒夫*¹・堀川 武夫Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* O157 surveillance in duty water flowed into sewage treatment plant

Fubito ISHIGURO, Chikako UTSUNOMIYA, Masako NAKAMURA, Tsuneo ASADA, Takeo HORIKAWA

1 はじめに

下水中の病原性細菌は、下水処理場流域の汚染実態を反映するとして報告がなされている¹⁾。すなわち、その地域の患者および潜在的患者の動向を知る手がかりになる。そこで、志賀毒素産生性大腸菌(以下、STEC)感染症情報を発生初期段階で把握し、下水中の動向を併せて解析することにより、さらなる発生・拡大防止に活用するために、福井県内のSTEC感染症(表1)の86%を占めるO157を標的に平成9年度より下水から分離を試みてきた。今回、3年7ヶ月間の下水中のO157検出状況を示すとともに、患者由来株との関連性も調べたので報告する。

2 材料と方法

2.1 材料

2.1.1 下水

1999年9月から2003年3月まで、坂井郡三国町池見の九頭竜川浄化センター(対象人口は約12万人)およびその関連施設の竹田川ポンプ場の2ヶ所において、前者では月2回、後者では月1回下水流入水を採取した。

2.1.2 河川水

1998年9月から2001年10月まで、福井市内の底喰川河川水(1回の調査につき2~9地点:検体)を延べ71検体採取した。

2.2 方法

2.2.1 分離方法

下水は約200mLを0.45 μ mのフィルターで濾過し、フィルターをノボジオシン加mEC 15mLに投入し、42℃ 18時間培養した。免疫磁気ビーズ処理²⁾後、CT-SMACに塗沫し、35℃20時間培養した。疑わしい集落をほとんど釣菌し、CLIG培地およびLIM培地で生化学性状を確認後、抗O157血清で同定した。河川水の場合は3Lを検体量とし、方法は下水の方法に準じた。なお、O157が分離された場合は、PCRによる stx 遺伝子の検索には、Adrienne *et al*³⁾のプライマーを用いた。

2.2.2 分離株の性状

パルスフィールドゲル電気泳動(以下、PFGE)は、国立感染症研究所の方法に基づき実施した。なお、制限酵素はXba Iを使用した。薬剤感受性試験は、センシディスク(BBL)を用い、12剤(ABPC、SM、TC、CIP、KM、CTX、CP、SXT、GM、NA、FOM、TMP)に対して実施した。ただし、TC耐性株はOTCを追加した。

3 結果

3.1 O157検出状況

3.1.1 下水からの定点別および年度別の検出状況

表2に示すとおり、定点別の検出率は九頭竜川浄化センターが62.3%で、竹田川ポンプ場の40.5%より高かった。

表1 福井県における志賀毒素産生性大腸菌感染症発生状況(1996年~2002年)

血清型別	stx	1996年	1997年	1998年	1999年	2000年	2001年	2002年
O157:H7	2	2	1	1	3	5	18(11)	3(3)
	1+2	8	8	10	25	8	41(26)	27(12)
O157:HNM	1+2						2(1)	
O26:H11	1		2	3	1	1	3(1)	5(1)
	1+2						2(1)	
O26:HNM	1				1	2		
O111:HUT	1	2				1		
O63:H6	2							1(1)
O91:HNM*	1						1(1)	
O114:HUT	2				1			
O128:H2	1			1				
		12	11	15	31	18**	67(41)	36(17)

()は件数を示す。* eaeA遺伝子陰性。** O157に1株はH型別等は不明。

*¹ 自然保護センター

表2 下水からのSTEC O157の検出状況

1 年度別の検出状況

	1999年		2000年		2001年		2002年		計	検出率%	
	N*	P	N	P	N	P	N	P			
九頭竜浄化センター	13	9	21	14	21	12	22	13	77	48	62.3
竹田川ポンプ場	6	4	10	4	10	3	11	4	37	15	40.5

* N: 検体数 P: 陽性数

2 月および季節別の検出状況

月	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2
検体数	12	0	5	9	9	9	10	12	12	12	12	12
陽性数	4	0	4	6	7	7	6	8	9	5	4	3

季節別 3~5月 47.1%* 6~8月 74.1% 9~11月 67.6% 12~2月 33.3%
* 季節別の検出率

また、年度別の検出率は、年間を通して検査を実施しなかった1999年を除くと、48~58%の範囲内であった。合計すると、114検体中63検体から検出された。

3. 1. 2 下水からの月および季節別の検出状況

表2に示すとおり、季節別の検出率が高かったのは夏季の74.1%、次いで秋季の67.6%であった。それに対し、春季および冬季は低い傾向であった。

3. 1. 3 河川水からの検出状況

71検体中5検体から検出できた(表3)。検出された地点は下流域の玉川橋および新境橋の2地点で、検出時期は9月と10月であった。

3. 2 環境およびヒトから検出されたSTEC O157の毒素型別検出数

STEC O157: H7の毒素型は、下水由来株では stx 2単独産生株が56.8%、 stx 1+2産生株は37.0%であった(表3)。一方、ヒト由来株は stx 1+2産生株が74.1%を占めた。また、PFGE型は下水由来株はほとんどが株ごとに異なるのに対し、ヒト由来株は株数に比べてかなり少なかった(平均すると約2.6株にひとつの型)。

表3 環境およびヒトからのSTEC O157の検出状況 (1999年9月~2003年3月)

血清型	stx	下水由来 (114検体)	河川水由来* (71検体)	ヒト由来
O157: H7	1	5(2)**	1	
	2	46(43)	3(2)	28(11)
	1+2	30(29)	2(2)	80(30)
O157: HNM	2	1		2(1)
	1+2	1		

*福井市内の底喰川、調査期間は1998年9月~2001年10月
**(*)はPFGEパターン数を示す。

3. 3 STEC O157: H7において患者由来株と同一のPFGE型を示す下水由来株について

下水由来株のうちヒト由来株と同一のPFGE型を示した株が、患者発生時期に前後して15検体(9種類の型)から検出できた(表4)。たとえば、EグループのIIa, IIa, Iの型は、2001年7月10日から8月20日までと、10月3日に発症あるいは検便を実施した11名の患者あるいは保菌者から分離され、下水からは2001年11月7日に採取した検体から検出された。浄化センターのある坂井郡在住の患者等は10月3日に発症した1名だけであった。また、GグループのND, IIa, Iの型は2001年8月17日から8月28日に発症あるいは検便を実施した7名から分離され、下水からは8月22日の検体から検出された。坂井郡在住の患者等は4名であった。このようなグループに対して、A~DおよびFグループは患者発生前後に下水から延べ10回にわたって、同一の型が検出されているものの、坂井郡在住者からは分離されなかった。なお、JおよびKグループのように坂井郡在住の患者等が確認されていても、下水から検出されないこともあった。

3. 4 STEC O157: H7における薬剤感受性試験成績

下水由来株では84株中11株(13.9%)がいずれかの薬剤

表4 STEC O157において患者由来株と同一のPFGEパターンを示す下水由来株について

グループ	PFGEパターン	患者・保菌者数	患者発症年月日 & 保菌者検便日	下水採取年月日
A	IIIk, IV, IV	2	99.10.8	99.10.7, 10.20, 11.4
B	III _m , IIIa, III	1	00.7.31	00.7.19, 8.2
C	II _d , II _c , I	3	00.8.2, 8.9, 8.10	00.8.2
D	ND, ND, III	1	01.6.29	01.6.20, 7.4, 8.1
E	IIa, IIa, I	11(1)*	01.7.10~8.20, 10.3	01.11.7
F	III _b , IV, IV	10	01.8.14~8.24	01.8.22
G	ND, IIa, I	7(4)	01.8.17~8.28	01.8.22
H	IIa, ND, I	4(1)	02.5.12~6.6	02.6.5
I	Ia, I, ND	9(1)	02.7.31~9.1	02.8.7
J	IIa, ND, ND	9(1)	01.8.17~8.28	
K	ND, IV, IV	7(2)	01.9.1~9.8	

()は浄化センターのある坂井郡在住者数を示す。

表5 STEC O157 : H7における薬剤感受性試験成績

由来	stx	分離株数	耐性株数	耐性パターン
下水	1	5	0	
	2	47	3	SM(2)、SM(1)*
	1+2	32	8	SM・TC・OTC(5)、ABPC・SM・TC・OTC(2) SM・NA・FOM・TMP・KM*・CIP*(1)
河川水	1	1	0	
	2	3	0	
	1+2	2	1	ABPC・SM
ヒト	2	28	1	SM・TC・OTC・GM
	1+2	80	12	ABPC・SM・TC・OTC(3)、ABPC・SM(1) ABPC・SM・TC(3)、SM・TC・OTC(3) ABPC・SM・TC・OTC・CP(1)、SM*(1) SM・OTC(3)、ABPC・SM・OTC(2)
牛**		313	75	

()は株数を示す。*は中間の感受性 **牛直腸内容物、品川らの調査結果

に耐性を示した(表5)。その耐性パターンはSM・TC・OTCの3剤に耐性を示したのが5株で、この3剤にABPCを加えた4剤に耐性を示したのが2株であった。また、NA・FOM・KMなど6剤に耐性を示す株が1株あった。河川水由来株では、6株中1株(16.7%)がABPC・SMの2剤に耐性を示した。参考までに同時期のヒト由来株についてみると、108株中12株(12.0%)がいずれかの薬剤に耐性を示した。その耐性パターンはABPC・SM・TC・OTCの4剤に耐性を示したのが3株、ABPC・SM・TCあるいはSM・TC・OTCの各3剤に耐性を示したのが3株ずつであった。

4 考 察

調査定点の浄化センターは家庭排水およびし尿が中心の分流式であることから、下水由来とヒト由来のSTEC O157株のstx産生型は同様の傾向がみられると予想された。しかし、下水由来のO157株におけるstx産生型はstx 2産生株がstx 1+2産生株よりも多く、56.8%を占めたのに対して、福井県全体のヒト由来株は田中らの報告⁴⁾および病原微生物検出情報⁵⁾と同様にstx 1+2産生株の方が多く、74.1%を占めた。一方、牛糞便由来のSTEC O157のstx産生型についての報告⁶⁾をみると、stx 2産生株がstx 1+2産生株よりも多く、35株中21株(60.0%)であった。また、別の報告⁷⁾では牛糞便および牛枝肉由来の310株中175株(56.4%)がstx 2産生株であった。これらの状況を総合的にみると、当該浄化センターは分流式とはいえ、農村地帯に位置することから多少なりとも畜産・農業排水、すなわち、牛舎等の洗浄水の一部が流れ流れ込んでいのではないと思われる。この点については、浄化センター職員も認められていた。

このような状況下、下水由来株は63検体から75種類のPFGE型が検出され、そのうちヒト由来株と同一のPFGE型を示した株が、患者発生前後に前後して15検体から9種類の型が検出された。しかも、患者および保菌者が浄化セ

ンターのある坂井郡にいても検出されたのが5種類(延べ10検体)もあったのは興味深い。これは、不顕性感染者および保菌者が相当数存在していたことを表していると思われる。一方、流行予測の観点からPFGE型別に今回のデータをみると、表4に示すとおり、それぞれの最初の患者発症日より下水採取日が早い、もしくは同日のグループが4事例(A~D)あった。理想的には、鹿児島県環境保健センターが報告しているように¹⁾、下水からの検出が先行指標となることにより、O157感染症についての県民への注意喚起を促すことが可能となる。そのために、調査定点を増やすことが必要と考えられた。

次に、薬剤耐性株検出状況は、下水およびヒト由来株ともにSM・TC・OTCの3剤、あるいはこれにABPCを加えた4剤に耐性を示す株が多かった。この傾向は牛糞便および牛枝肉由来株においてもみられた。すなわち、品川らの調査結果⁸⁾をみると、使用薬剤は若干異なるものの(TCは未使用)、313株中75株(24.0%)が耐性を示し、その耐性パターンはSM・OTCの2剤に耐性を示したのが33株、ABPC・SM・OTCの3剤に耐性を示したのが12株であった。また、下水由来株の中に、FOM、KMなど6剤に耐性あるいは中間の感受性を示した株があったが、FOMおよびKMはO157感染症の治療薬として広く用いられており、今後本薬剤に対する耐性株の動向については継続的に監視する必要があると考えられた。

以上、今回の調査定点の浄化センターは分流式であるにもかかわらず、そこから検出されたO157株は、ヒト、環境および家畜等の様々な汚染源に由来すると考えられた。今回の調査から下水由来株においてヒト由来株と同様のPFGEパターンを示す株が9種類検出されたことから、下水中のO157株の分子疫学的調査を通じて、発生予防および拡大防止に繋げることも可能であると考えられることから、引き続き調査を継続する。

参 考 文 献

- 1) 上野伸広他：腸管出血性大腸菌感染症の流行予測に関する調査研究（第Ⅱ報），鹿児島県環境保健研究センター所報，3，97-101（2002）
- 2) 中川 宏他：免疫磁気ビーズ法を用いた人便からの腸管出血性大腸菌O157検査における増菌培養の検討，感染症誌，74，527-535（2000）
- 3) Adrienne W. Paton et al：Detection and characterization of Shiga toxicogenic *Escherichia coli* by multiplex PCR assays for *stx1*, *stx2*, *eaeA*, Enterohemorrhagic *E. coli hlyA*, *rfb* O111' and *rfb* O157, J Clin Microbiol. 36, 598-602（1998）
- 4) 田中 博他：中・四国地区における腸管出血性大腸菌感染症の疫学的解析と分離菌株の細菌学的検討，感染症誌，76，439-449（2002）
- 5) 感染症情報センター：＜特集＞腸管出血性大腸菌感染症 2003年5月現在，病原微生物検出情報，24，129-131（2003）
- 6) 久島昌平他：2種類の増菌培養法による牛の腸管出血性大腸菌O157保菌状況，獣医師会誌，54，391-394（2001）
- 7) 三輪憲永他：食肉等から分離された腸管出血性大腸菌O157およびサルモネラの薬剤耐性，獣医畜産新報，54，749-738（2001）
- 8) 品川邦汎：わが国における牛の腸管出血性大腸菌O157保菌状況と分離株の薬剤耐性，平成12年度日本獣医公衆衛生学会（中部）講演要旨集，95（2000）