

下水処理場流入水からの EHEC O157 検出状況

ーヒト由来株との比較検討ー

石畠 史・京田芳人・前田央子*1・望月典郎*2・堀川武夫

Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 Surveillance in Duty Water flowed into Sewage Treatment plant
 – Comparison of Isolates from Human and Sewages –

Fubito ISHIGURO, Yoshito KYOTA, Chikako MAEDA, Michio MOCHIZUKI, 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の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、腸管出血性大腸菌（以下、EHEC）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 EHEC 感染症の 82.6% を占める O157 を標的に平成 1996 年度より下水から分離を試みてきた。1999 年から 2002 年度までの結果は、年報 Vol. 2 に報告²⁾（以下、既報告）したが、今回は、第 2 報として 2003 年～2004 年度の下水中の 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

2003 年 4 月から 2005 年 3 月まで、坂井郡三国町池見の九頭竜川浄化センター（以下、K 処理場：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（以下、T ポンプ場）の 2 ヶ所、および福井市黒丸町の日野川浄化センター（以下、H 処理場：約 14 万人）および福井市菅谷町の境浄化センター（以下、S 処理場：約 6 万人）において、原則として P ポンプ場は月 1 回、その他の 3 処理場は月 2 回下水流入水を採取した。ただし、福井市の H 処理場では 2004 年の 6 月から 9 月にはさらに月 2～3 回多く採取した。

2. 1. 1 ヒト由来株

2003 年 4 月から 2005 年 3 月までに、県内の医療機関で分離された 37 株の EHEC O157、および当センターにおいて濃厚接触者糞便から検出された 15 株。

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、フィルターをノボバイオシン加 mEC15mL に投入し、42℃ 18 時間培養した。免疫磁気ビーズ処理後、CT-SMAC に塗抹し、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。なお、O157 が分離された場合は、PCR による VT 遺伝子の検索には、Adrienne et al³⁾ あるいは小林⁴⁾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⁵⁾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（アンピシリン(ABPC)、ストレプトマイシン(SM)、ST 合剤(SXT)、スルフィゾキサゾール(Su)、テトラサイクリン、シプロフロキサシン、カナマイシン、セフトキシム、クロラムフェニコール、ゲンタマイシン、ナリジクス酸、ホスホマイシン）に対して実施した。

3 結果および考察

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 1-1 に示すとおり、定点別の検出率は K 処理場が 57.1% と最も高く、次いで H 処理場が 49.1%、T ポンプ場が 41.7% で、S 処理場が 27.7% と最も低かった。既報告の K 処理場および T ポンプ場の結果はそれぞれ、62.3%、40.5% であり、今回の結果とほぼ同じであった（福井市は 2003 年度から開始した）。また、年度別の検出率は、坂井郡（K 処理場および T ポンプ場）では 2003 年および 2004 年度ともに 52% 前後であり、既報告と同様であった。一方、福井市（H 処理場および S 処理場）

* 1 丹南健康福祉センター

* 2 食品安全・衛生課

表1 下水からのEHEC O157検出状況

表1-1 年度別および施設別の検出状況

	2003年		2004年		計		検出率 (%)
	N	P	N	P	N	P	
坂井郡 K処理場	24	13	25	15	49	28	57.1
Tポンプ場	12	6	12	4	24	10	41.7
検出率(%)	52.8		51.4		52.1		
福井市 H処理場	21	7	32	19	53	26	49.1
S処理場	21	6	26	7	47	13	27.7
検出率(%)	31.0		44.8		39.0		
合計	78	32	95	45	173	77	
検出率(%)	41.0		47.4		44.5		

N;検体数 P;陽性数

表1-2 月別のO157検出状況

2003年度\月	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2
検体数	6	6	7	7	7	7	7	8	7	7	7	7
陽性数	1	4	3	1	2	5	2	7	3	2	1	1
2004年度												
検体数	7	4	8	10	9	10	10	7	7	7	7	7
陽性数	3	2	5	8	2	8	5	4	3	3	3	0

季節別 3～5月47.4% 6～8月50.1% 9～11月52.3%
12～2月23.8%

では2003年度が31.0%、2004年度が44.8%と坂井郡に比べて低かった。

下水からの月および季節別の検出状況

表1-2に示すとおり、月別にみると2003年および2004年度ともに月による差が大きいことが分かる。特に、2003年の10月、2004年の6月および8月は非常に高率に検出されている。季節別にみると冬季は23.8%と低かったが、その他の季節は47～52%とほぼ同様の検出率であった。既報告では夏季が74.1%、秋季が67.6%であり、今回とは異なる結果であった。このように2003～2004年の夏季および秋季が低くなった原因は、図1のように坂井郡では年間を通して40～55%の検出率であったことに因る。一方、福井市では6～11月に検出率が高くなり、地域により差がみられた。これは福井市では患者および不顕性感染者の影響を受けやすいのに対し、坂井郡は既報告5)に述べたように牛舎を多く抱える地域であるために、そのような結果になったと思われる。

2003年よりも患者等が多かった2004年度について、

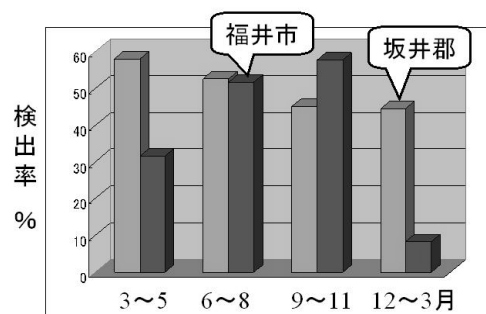


図1 下水の季節別検出状況

2003～2004年度

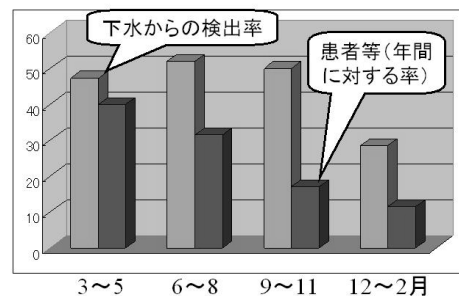


図2 季節別の下水からの検出率および患者等からの検出状況 2004年度

坂井郡および福井市の処理場の結果と比べると、図2のように患者等は春先に多く確認され徐々に減少したが、下水からの検出率は春季から秋季にかけてほぼ同様の検出率であり、パラレルの関係はみられなかった。

3. 2 ヒトおよび下水由来株のEHEC O157の毒素型別検出数および薬剤感受性

EHEC O157: H7の毒素型は、表2のとおりヒト由来株はVT 1+2産生株が57.1%とVT 2単独産生株よりも多いものの、既報告に比べ、その差は縮まりつつあり、2004年に限ってみればVT 2単独産生株が若干多かったのが注目された。全国的には病原微生物検出情報^{6,7)}によれば、2001～2002年および2003～2004年はいずれもVT 1+2産生株が約65%、VT2単独産生株が33.2%と変化はみられなかった。一方、下水由来株はVT 2単独産生株が62.8%を占めたものの、既報告に比べると若干減少している。また、PFGE型についてみるとヒト由来株はひとつの型に対し平均すると、既報告の2.6株から1.8株に減少し、下水由来株は1.1株から1.3株に若

表2 EHEC O157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
O157:H7	ヒト	2	22(11)*	2(2)	ABPC(I)**(2)***
		1+2	30(16)	6(3)	ABPC・SM・SXT・Su(2), ABPC・SM・Su(2)
	下水	2	54(44)	2(2)	SM・Su(1), TC(I)(1)
		1+2	32(24)	7(6)	SM・Su・SXT・ABPC(I)(2), ABPC(I)(2) SM・Su・TC・ABPC(I)(1), CP(I)(1)
O157:HNM	下水	2	7(4)	4(2)	SM(4)
		1+2	4(2)	0	

*()PFGE型数を示す **(I)は中間の感受性を示す *** ()の数は株数を示す

干ながら増加した。ヒト由来株において、このように減少したのはdiffuse outbreakと考えられた事例が少なかったためと思われる。

薬剤感受性試験結果は、ヒト由来株では52株中8株(15.4%)、下水由来株ではO157:HNMを含めて97株中11株(11.3%)が何らかの薬剤に耐性を示した(表2)。既報告の耐性率は前者が12.0%、後者が13.9%でありほぼ同様の結果であった。薬剤耐性パターンはVT1+2産生株において、両者ともにSM・Su・SXT・ABPCの4剤に耐性あるいは中間の感受性を示す株が確認された。O157:HNMではSMに耐性を示す4株中3株が同一のPFGE型を示したのは興味深いと思われた。

3. 3 EHEC 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

下水由来株のうち福井県の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9検体(5種類の型)から検出できた(表3)。

AグループのIIa IIa Iの型は2003年9月7日および13日に発症した患者から検出された後に、9月17日以降に下水5検体から検出されたが、患者等が確認されていない、福井市の処理場の延べ3検体(H処理場では9月17日と10月6日の2検体)からも検出された。

BグループのIIa IIa Iの型は2004年3月31日および4月1日発症の患者から検出された後に、4月24日に患者住所地のK処理場の下水から検出された。なお、このPFGE型の株は、同時期に石川県をはじめ、岡山県および香川県でも確認された⁸⁾(なお、この事例については、同じ年報に資料として詳細に報告)。

C～Eの3グループは患者あるいは保菌者よりも先行して下水から検出でき、CおよびEグループは患者等の住所地とは異なる処理場から検出された。すなわち、CグループのIIa IIa Iの型は2004年5月19日にK処理場から検出された後の、5月31日に発症した鯖江市の患者から検出され、EグループのVII ND NDの型は8月2日にS処理場から検出された約2ヶ月後の10月17日に発症した池田町の患者から検出された。Dグループ

のIIa IIc Iの型は2004年8月16日にS処理場から検出され、その翌日と8月28日に発症した患者から検出された。このように、各グループの患者等は2～3名と少なかったものの、A、CおよびEグループで確認されたように、患者由来株と同一のPFGE型のO157が、患者等の住所地とは異なる処理場の複数の検体から検出されたことから、県内一円に不顕性感染者が相当数いたものと思われた。一方、患者等よりも先行して下水から検出されたのが3グループあったものの、調査研究目標である患者の流行予測までには至らなかった。

次いで下水由来株の中に、福井県内では患者等から検出されていないものの、他県で患者等から検出されている株と同一のPFGE型を示すグループが5種類あることが国立感染症研究所からの情報により判明した。FグループのND ND Iの型は2003年4月16日および5月7日に3処理場から検出され、4月7日および11日には石川県松任市の患者から、さらに宮崎県でも検出されていた。GグループのIII' IVa VIIIの型は2003年5月7日に坂井郡の2ヶ所で検出され、5月17日～20日には小松市の患者から、5月29日～6月18日には岐阜県高山市で集団発生の43名の患者および保菌者から、さらに茨城県でも散発患者から検出された。HグループのND ND NDの型は2004年8月2日にS処理場から検出され、7月上旬にはこれも茨城県の散発患者から検出された。

IグループのND IIa NDの型は2004年の8月16日にH処理場から検出され、7月下旬の石川県をはじめ全国19都府県もの患者および保菌者から検出され、この型(後にtype No.292)の分離比率は、2004年の全国検出数の5.7%を占めた⁷⁾。JグループのII d IIc Iの型は2004年9月16日にK処理場から検出され、9月初旬に神戸市でも散発患者から検出された。

以上のことから、県内にはいくつかの遺伝子型のO157を保有する潜在的な患者および保菌者がかなりいたのではないかと推測された。ところで、下水流入水を調べることにより、患者発生の流行予測ができる可能性を求めて、2003年度からは調査定点を増や

表3 EHEC O157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

グループ	PFGE型	患者・ 保菌者数	住所	患者発症年月日 &保菌者検便日	下水採取年月日
A	IIa IIa I	2	武生市、坂井町	03.9.7, 9.13	03.9.17(S,H,K)*, 10.5(K), 10.6(H)
B	IIa IIa I	3	松岡町、あわら市	03.3.31, 4.1, 4.7	04.4.24(K)
C	IIIk ND III	2	鯖江市	5.31, 6.6	04.5.19(K)
D	IIa IIc I	2	福井市	8.17, 8.28	04.8.16(S)
E	VII ND ND	2	池田町	10.17	04.8.2(S)
F	ND ND I	石川県・宮崎県で散発			03.4.16(K,P), 5.7(H)
G	III' IV VIII	石川県・茨城県で散発、岐阜県で集団発生			03.5.7(K,P)
H	ND ND ND	7月上旬茨城県で散発			04.8.2(H)
I	ND IIa ND	7月下旬～8月上旬に全国で散発			04.8.16(H)
J	II d IIc I	9月初旬神戸市で散発			04.9.16(K)

*()のS:福井市境浄化センター H:日野川浄化センター K:坂井郡九頭竜浄化センター P:竹田川ポンプ場

すために福井市の2ヶ所の処理場を追加し、さらに2004年度は患者発生が多いと予想された6月～9月にはH処理場の検体採取を週1回のペースで行った。それにもかかわらず、2003年および2004年の2年間に確認された患者等由来のO157のPFGE型数は27種類（患者および保菌者数は49名）であったが、このうち下水から検出されたのは5種類（患者等は11名）に過ぎず、流行予測に繋がるデータを得ることはできなかった。

4 まとめ

- ・ 従来の調査結果から不顕性患者が多くいることが推定されたことから、患者および保菌者から検出するよりも早く、下水からO157を検出することにより流行予測に繋がらないか調査した。
- ・ 患者等由来株と下水由来株で同一のPFGE型を示す株が5種類検出されたが、流行予測には至らなかった。

5 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) 石畝 史他：下水処理場流入水からのSTEC O157検出状況（第1報），福井衛環研年報. 1. 92-95（2003）
- 3) Adrienne W. Paton et al. : Detection and characterization of Shiga toxigenic *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) 小林一寛：腸管出血性大腸菌の同定法 2. PCR法，臨床検査，36. 1334-1338（1992）
- 5) 感染症研究所細菌部. 腸管出血性大腸菌 O157 の検出・解析等の技術研修マニュアル. 17-27（1997）
- 6) 感染症情報センター：＜特集＞腸管出血性大腸菌感染症 2004年5月現在，病原微生物検出情報，25, 138-143（2004）
- 7) 感染症情報センター：＜特集＞腸管出血性大腸菌感染症 2005年5月現在，病原微生物検出情報，26, 137-140（2005）
- 8) 児玉洋江：腸管出血性大腸菌 O157 による diffuse outbreak 事例. 平成 16 年度地衛研全国協議会東海・北陸支部細菌部会抄録集，13（2005）