

鳴瀬川水系における腸管出血性大腸菌の動態について

Environmental dynamics of Enterohemorrhagic *E.coli* in NARUSE river

畠山 敬 田村 広子*¹ 三品 道子
佐々木美江 谷津 壽郎 秋山 和夫*²

Takashi HATAKEYAMA, Hiroko TAMURA, Michiko MISHINA
Mie SASAKI, Juro YATSU, Kazuo AKIYAMA

平成16年度調査で鳴瀬川からSTX (Shiga toxin=Vero toxin) 遺伝子および毒素産生菌が検出されたが、その発生原因として酪農場の関与が示唆され、河川での菌の増減と降雨との間には関係があるものと推察された。また、7月のカキからは腸管出血性大腸菌の存在を示すSTX遺伝子が検出されることから、河口水の汚染が養殖カキの大腸菌汚染に深く関わりがあるものと考えられた。

キーワード：Shiga-Toxin；酪農場；降雨

Keywords：STX；dairy farm；rainfall

1 はじめに

平成16年度から実施しているプロジェクト研究（「微生物汚染と環境」）によって鳴瀬川中流域、河口水から病原因子を持つ大腸菌が検出されることが明らかとなった。さらに、同河川からはSTX遺伝子（以下、*stx*；毒素遺伝子）が検出されるばかりでなく、各種血清型の腸管出血性大腸菌（以下、EHEC）が分離されることが判明した。菌及び遺伝子は6月から8月の夏季間に集中的に観察され、上流である漆沢ダム湖水からは検出されなかった。

我々は過去にEHEC感染症と家畜との関連を数多く証明しているが¹⁾、鳴瀬川流域一帯は夏場にヒトのEHEC感染症が多発する地域であり家畜の飼養頭数も多いことから、この地域の支流河川が鳴瀬川中流域汚染の原因であることが疑われた。また、河口水から各種の病原因子や*stx*を保有する大腸菌が検出されたことは、河口付近あるいは沿岸海域に生息する魚貝類を汚染していることが十分考えられた。

そこで、調査の対象を「鳴瀬川中流域に流入する支流等を含めた、河川に存在するEHECの季節的変動」および「河口付近に生息する貝類からのEHECの検出」の2点とし、EHECの河川における挙動、ならびに河口付近を生息域とする食品（カキ）への汚染を明らかにすることを目的とした。

2 材料および方法

(1) 材料と採材地点

検査材料は河川水2Lとし、昨年度実施した鳴瀬川上流、中流、河口の他に、鳴瀬川の中流域に流れ込む3支流河川（花川・保野川・田川）を調査ポイントとして加えた計6定点で、5月から11月までの期間に毎月1回河川水を採取し、*stx*を指標としたMPN値の測定及びEHECの分離を行った（図1）。さらに、必要に応じて調査定点の追加を行った。

また、魚介類の調査はカキを対象として5・7・9・10・12月に松島湾付近の漁港から買い上げ、河川水と同様に*stx*の検出及び菌の分離を試みた。

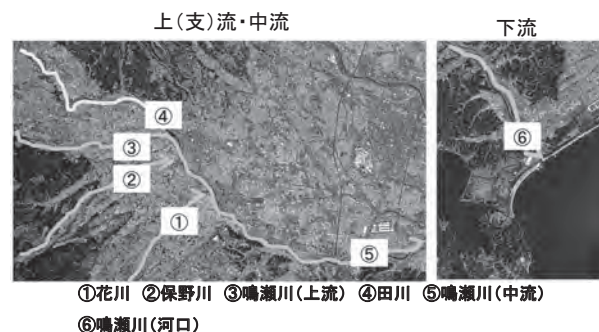


図1 調査定点

(2) 方法

河川水の菌数は*stx*を指標にしたMPN法（3管法）を用いて行い、遺伝子が検出された試験管の本数から

* 1 現 循環器・呼吸器病センター

* 2 現 宮城県公衆衛生協会

EHECの菌数を推定した。すなわち、河川水500・50・5mlの各3本に適量のmEC培地または粉末(栄研科学)を加えて37℃で18時間増菌培養した。その後、培養液1mlを採取してTaKaRa社製のVero毒素検出用プライマー(EVC-1・2)を用いPCRでstxを確認した。遺伝子が検出された検体は、DynaI社製anti-O157ビーズとO26抗血清(デンカ生研社製)を用いて自作したanti-O26ビーズにより集菌しDHL寒天培地及びCT-SMAC, CT-RMAC等の鑑別培地で分離を行い、その他の血清型菌の分離にはPCRによる絞込み法とコロニーハイブリダイゼーション法²⁾を併用した。

また、カキからの菌の分離は、E.coli MPN試験で大腸菌が陽性になった検体にPCRを実施し、以下、河川水と同様に分離を行った。分離された菌株はstxの他にもST(耐熱性毒素)、EAST1, eaeA³⁾などの病原因子を検索し、必要に応じてPFGE⁴⁾により過去に分離されたヒト感染症原因菌との遺伝子パターン比較を行った。

3 結果

(1) 河川水におけるstxの挙動

5月の調査時点では5定点からはstxは検出されな

かったものの、支流である田川では既にMPN0.9(／500ml)が検出された。6月の調査では全ての定点でMPN値が低くこの傾向は見られなかったが、7月には気温の上昇とともに各定点でMPN値が高度に上昇し、支流の保野川で110、花川及び鳴瀬川中流で46と全ての定点で6月の30から150倍以上の値を示した。しかし、8月から10月初旬までの調査ではいずれの定点もMPNが0.6以下と遺伝子はほとんど検出されず、調査月により検出率に大きく差があることが判明した。一方、10月中旬及び11月初旬の調査では9月までの採材時の気象条件とは異なり、比較的多量の降雨後に採材を行った結果、調査したほぼ全ての定点でMPNが前回より上昇した(図2)。また、これらの現象は冬季間の調査でも認められることから、stxの河川への出現は季節だけでなく河川の増水と関係があることが示された。

(2) 分離された大腸菌の血清型と保有する病原因子

河川から分離されたEHECの血清型はO1(VT1)1株、O26(VT1)13株、OUT(VT1)5株、OUT(VT2)2株であり、EHEC以外にもほぼ全ての調査期間を通じてEAST1, eaeA, ST等の病原因子を保有する大腸菌が分離された(表1)。

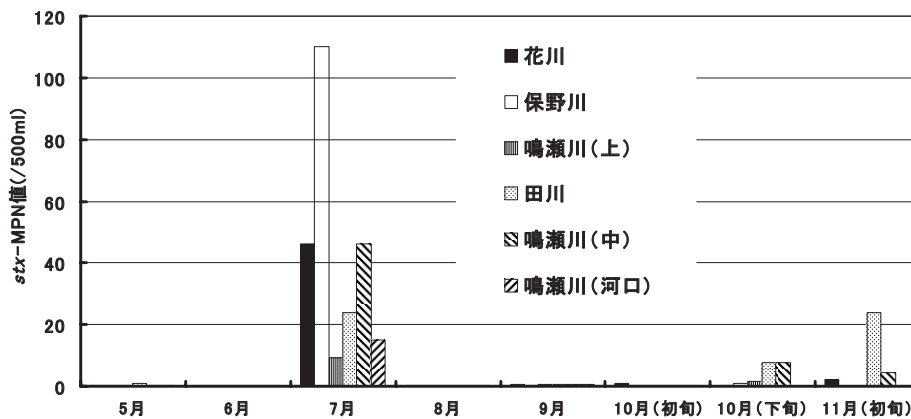


図2 各調査定点でのstxを指標にしたMPN値の季節的変動

表1 河川水由来大腸菌の保有するヒト病原因子

H16・H17	5月	6月	7月	8月	9月	10月(下)
鳴瀬川(中流)	063(EAST1)	0126(eaeA) 08(EAST1)		08(EAST1)		018(EAST1, ST)
鳴瀬川(河口)		OUT(V1) 0136(eaeA) OUT(eaeA)				063(eaeA)
花川			026(V1, eaeA)※			
保野川			01(V1)			
鳴瀬川(上流)					OUT(V1) OUT(V2, EAST1)	
田川	OUT(V1)		OUT(V1, eaeA)			026(V1, eaeA)

EAST1; Enteraggregative E.coli heat-stable enterotoxin gene保有株

eaeA; E.coli attaching and effacting gene保有株

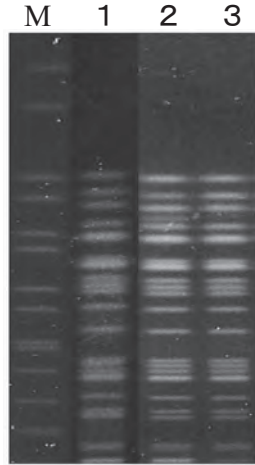
ST; heat-stable enterotoxin産生株

V1; STX1型毒素産生株

V2; STX2型毒素産生株

(3) 分離されたO26株のPFGE解析

河川から7月に分離されたO26株についてPFGE解析を行った結果、1株(O26:HNM)に一昨年度発生したヒト感染症株と遺伝子パターンが一致する株が存在することが判明した(図3)。



M : DNAマーカー
1 : 河川水由来株(O26:HNM)
2・3 : ヒト感染症由来株(O26:HNM)

図3 河川水由来EHECのPFGEパターン

(4) 支流における毒素遺伝子の検出

さらに、支流の汚染原因を探るため花川及び田川において通常の定点よりさらに上流に調査点を設けMPNの比較を行った。その結果、図4に示すように両河川ともに通常の定点から stx が検出されるにもかかわらず、上流域では遺伝子が全く検出されないこと。また、両調査地点間には家畜の集団飼育場が存在することから、これらが下流河川のEHEC汚染源である可能性が示唆された。

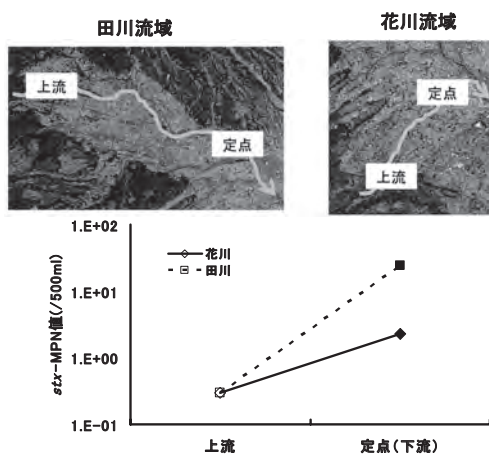


図4 支流域における stx の検出

(5) カキからの stx の検出

7月に採取したカキ2検体からPCRにより毒素遺伝子が検出されたが、検体から菌を分離することはできなかった(図5)。カキは大腸菌MPNが3500(／100g)お

よび330と調査期間中最も高かったが、7月は鳴瀬川河口における毒素遺伝子MPNも15(／500ml)と最も高く、カキから stx が検出された時期と一致した(図6)。

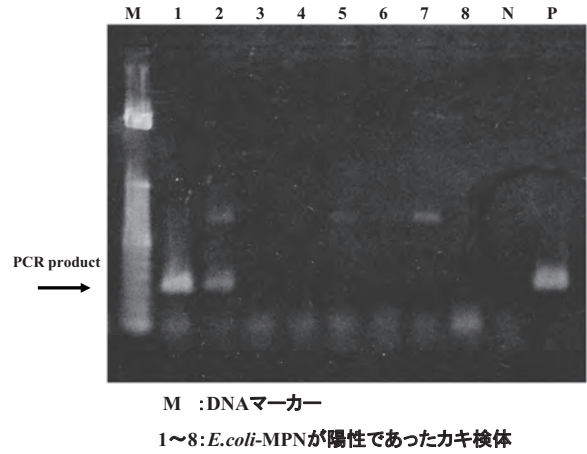


図5 7月の養殖カキから検出された stx

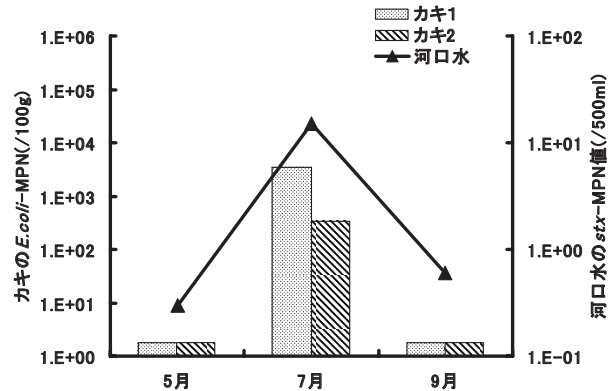


図6 カキの大腸菌数および河口水中の stx の推移

4 考察

河川水からのEHECの分離は他の地方衛生研究所でも試みられておりO157, O26, O111などの代表的なヒト感染症原因菌が存在するという報告がなされている⁵⁾。しかし、その報告の多くは比較的人口の密集する都市圏を流れる水系で行われたものであり、発生源に至る報告は少ない。我々も、昨年度の調査により鳴瀬川流域の河川水より多くの病原因子を保有する大腸菌およびEHECが分離されることを明らかにしたが、毒素遺伝子は比較的人口の少ない鳴瀬川の上流からも検出されることから追跡調査により原因を特定することが可能と思われた。また、鳴瀬川河口は代表的なカキの養殖地帯であり、河川の汚染は直接に食品の汚染に至る可能性がある。そこで、今回我々は、鳴瀬川の支流等を含めた河川でのEHECの季節による挙動と沿岸で養殖されるカキのEHEC汚染の2点に注目し調査を行った。

当初、我々は夏季に環境中でEHECが増殖し河川へ出現するという関係を想定していた。実際に、初期の調査では河川の毒素遺伝子は5月に最初に確認され、6月に

一時減少するものの7月には再び大きく上昇した。しかし、気温の最も高い8月・9月の調査では河川の毒素遺伝子のMPN値は低く、むしろ秋以降に上昇するという予想外の現象が観察された。そこで、夏から秋までの調査時の気象状況等を考察したところ、MPN値が上昇した時期の採材は7月を含め全て降雨後に行われていることが明らかとなった。7月に見られたような高いMPN値は示さないものの冬季の調査でも同様の結果であったことから、河川へのEHECの出現には気温や季節的なファクターだけでなく、降雨が深く関与していることが判明した。また、支流のさかのぼり調査によって河川でのEHECの出現には酪農場の存在が深く関連していることが示唆され、降雨による畜産雑排水の増加あるいは混入が河川を汚染する原因であることが推察された。

さらに、貝類の調査により7月のカキから毒素遺伝子が検出されたが、河口水から大量の毒素遺伝子が検出された時期とカキの大腸菌汚染が観察された時期は同じであり、降雨により支流河川に流れ込んだEHECが河口か

ら海岸域に拡散しこの時期の養殖ガキを汚染したことが考えられた。

5 参考文献

- 1) 畠山敬, 山口由美, 佐々木美江, 渡辺節, 齋藤紀行, 秋山和夫, 今野明日香, 小川今日子, 千葉文明, 川向和雄: 宮城県保健環境センター年報, 21, 52, (2003)
- 2) 畠山敬, 神尾好是: 宮城県獣医師会会報, 57, 138, (2004)
- 3) 坂崎利一編: 食水系感染症と細菌性食中毒, 210, (2000)
- 4) 渡辺治雄: 厚生労働科学研究新興・再興感染症研究事業 平成15年度総括・分担研究報告書「食品由来感染症の細菌学的疫学指標のデータベース化に関する研究」, 10, (2003)
- 5) 山内昌弘, 石津真理子, 菌輝久, 横田正春, 大中隆史, 田中智之: 堺市衛生研究所年報, 18, 47, (2000)