

**腸管出血性大腸菌O157:H7の
土壌での生存に関する疫学研究**

杉山 芳宏

美作大学・美作大学短期大学部紀要（通巻第49号抜刷）

論 文

腸管出血性大腸菌O157:H7の土壌での生存に関する疫学研究

Survival of enterohaemorrhagic E.coli O157:H7 in soils as an environmental factor of epidemiology

杉山 芳 宏

【はじめに】

大腸菌*Escherichia coli*は通性嫌気性のグラム陰性桿菌であり、通常動物の大腸の内容物には $10^7 \sim 10^{10}$ 個/ml (またはg)程度常在している。大腸菌のO抗原の違いは多様でO1~O173 (今後増える可能性あり)に分類され、さらに鞭毛抗原もH1~H56とに分けられている。これら、大腸菌の中には動物 (特にヒトである) に病原性を示すものがあり、病原因子により、腸管毒素原性大腸菌、腸管病原性大腸菌、腸管侵襲性大腸菌、腸管凝集性大腸菌、腸管出血性大腸菌などに分類される¹⁾。

特に腸管出血性大腸菌は、1982年のアメリカのハンバーガーによる集団下痢症米国で報告されて以来、国際的に集団食中毒の事例が相次ぎ、現在日本では全国的に本菌の食中毒の発生が認められ、注目されている。腸管出血性大腸菌血清型O157は伝播能が高く、集団発生しやすいこと、潜伏期は4~8日、下痢、腹痛を伴い約半数程度の患者では赤痢様の激しい血便を伴うことが知られている²⁾。また、本菌による豚の浮腫病は1938年の報告があり、1977年のヒトでの初報告よりも古くから知られている³⁾。ただ、近年大流行を引き起こしているO157:H7菌はウシとの関連が深く、その感染源、感染経路には必ずウシが関わっている。ウシの場合は、本菌に感染してもほとんど症状は示さず、糞便に菌を長期排泄するキャリアーの役割を担っている。ウシでは腸管出血性大腸菌の汚染が国により10%~25%と報告される。特にウシでは血清型O157の汚染は0.5%~5%の場合が多く、平均的には1%前後

だが、高度汚染牧場等では5%以上になる場合もあり、これは日本でも同じような傾向がみられる。その他、動物ではO157病原性大腸菌の分離例は乏しく、ヤギ、シカなどで報告があるに過ぎず、家畜、ペット、野生動物などほとんど検出例がない³⁻⁸⁾。しかし、ウシを始めとした、ブタ、ニワトリなどの実験感染から反芻獣以外でも長期に渡り、糞便等より菌が検出される⁹⁻¹¹⁾。通常、糞便に含まれる菌が次への感染源になるのであるが、野外では動物の糞は土壌と混じり、その大地を汚染する。しかし、土壌を汚染した菌は、どれくらい生存し、水など他の環境の汚染源になるのかは不明である。そこで、腸管出血性大腸菌の自然感染が成立する要因として、土壌での腸管出血性大腸菌の生残を検討した。

【材料と方法】

菌株：使用した菌株はE.coli O157:H7ウシ由来株である。

土壌：用いた土は赤土 (粘土質の土壌)、黒土 (関東に比較的広く分布し、牧場の土や田畑の土に近い)、砂 (公園の砂場、川、海などにみられる粒子の小さい石) および有機、無機肥料を人工的にくわえた耕作土を用いた。それぞれ20gを50ml遠心管にとり、オートクレーブ滅菌したもの、および未滅菌のものを用意した。

大腸菌生残実験：普通寒天培地 (ニッスイ) で37℃、24時間培養した大腸菌をPBS 10mlに浮遊し、その菌液を各種土壌に加え、土壌が菌液に浸されるようにし

て、よく混和した。それら各種土壌3サンプルづつを4℃、23℃、37℃に乾燥しないように保管して、定期的に菌数の測定を行った。

菌培養および菌数測定：腸管出血性大腸菌分離用のm-EC培地（ニッセイ）を用いて、定期的に土壌と混じた菌液を採取して、PBSで段階希釈後、培地に接種し、37℃、24時間培養後、発育した典型コロニーを計測した。

【結果と考察】

腸管出血性大腸菌は、近年のヒト集団感染事例からも食品衛生的に注目されるに至ったが、その自然界における存在や感染サイクルなどの疫学的データは不足している。そこで、今回は動物から排泄される糞便中の腸管出血性大腸菌が大土と混じた後、その土壌で菌がどのくらい生存するかを検討した。

実験的に各種土壌に病原性大腸菌を接種し、温度管理し、菌の生残期間を調べた結果は図1、2、3に示す。それぞれ、保持温度は37℃、23℃、4℃であり、これら温度が対応する季節は、37℃が夏期、23℃は春、秋期、4℃は冬期と考えられる。腸管出血性大腸菌は各種土壌に $10^{5.6}$ CFU/mlで接種された。各種土壌中で接種後1日目には菌数の増加がいずれの温度でも認められた。各保管温度では、37℃の条件で菌の消滅が比較的早く、3ヶ月程でほとんど検出されなくなる。しかし、23℃の条件では3ヶ月後もかなりの菌数が分離される土壌が多かった。また、逆に37℃よりは緩やかではあるが、4℃でも早期に死滅する菌が多く、3ヶ月後の土壌には少ない菌数しか生残しなかった。これは37℃の場合、細菌の増殖活性も高いため、早期の栄養欠乏が起こり菌の死滅につながることで、加えて他の微生物の増殖活性も高いことから、生残性が低下したものと考えられる。4℃では腸管出血性大腸菌は増殖が殆どできないことから、初期の一時的な増殖の後、死滅するのみであり、他の温度よりも死滅しやすいと推測された。また、28日目すなわち約1ヶ月の間は、各種の設定条件いずれも高い菌数が土壌中に残存することが判った。すなわち、動物に再感染するのであれば、

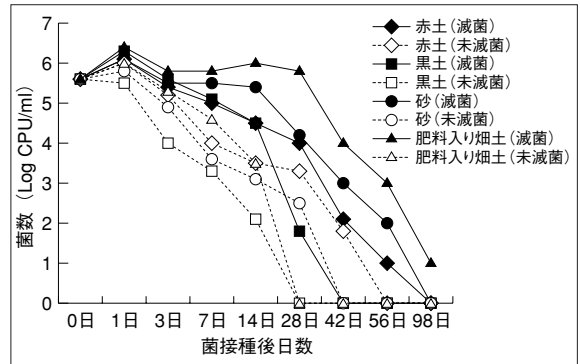


図1 37℃保持における土壌中での大腸菌の生残数

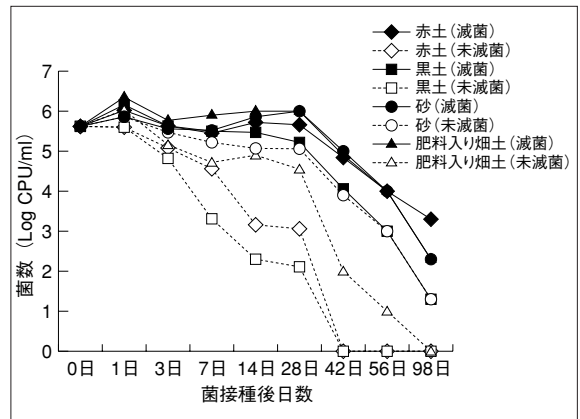


図2 室温23℃保持における土壌中での大腸菌の生残数

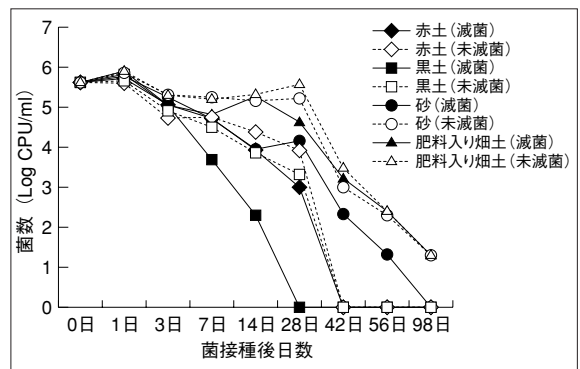


図3 4℃保持における土壌中での大腸菌の生残数

糞便が土壌を汚染後1ヶ月までが可能性が高いことを示唆している。

さらに、土壌の種類別では肥料入りの栄養価が高い土壌で生残性の高い傾向があった。また、興味深いことでは、37℃と23℃では滅菌土壌での病原性大腸菌の

生残性が高いのに対し、4℃では逆の傾向が認められた。通常は、未滅菌の場合、他の細菌や微生物に阻害されて死滅、排除されやすいのであるが、細菌が増殖出来ない温度4℃（冬場）では、他の細菌や微生物の増殖も抑制されて、その阻害は抑制される。しかし、未滅菌の土壌の状態がより生残性が高いということは、滅菌操作という加熱処理により、土壌の中に有害な物質が増えた、または菌の生残にとって有用な物質が減ったことが推測される。また、保存温度に関わらず、黒土では菌の生残性が他の土壌と比べても低い傾向が認められた。この黒土については今後さらに検討したいと考えている。

結果より、気温条件にもよるが、土壌中でも病原性大腸菌は3ヶ月以上生存する可能性があることから、ウシの放牧される牧場では地面にウシの糞が落ち、またそれが踏まれることなどから湿った土壌中に病原性大腸菌が長く生残し、牧場の汚染を継続させるであることが示唆された。しかし、実際の汚染牧場の土壌を検査すると腸管出血性大腸菌の分離は出来なかった（データ非公開）。ただ本実験上では土壌からの本菌分離も十分に可能性があることから、調査例数を増やすことにより菌分離が出来るものと考えられる。

【参考文献】

- 1) 竹田美文監修：病原性大腸菌O157（腸管出血性大腸菌）近代出版：臨床と微生物（臨時増刊号）Vol.23 1996
- 2) Konowalchuk et.al. : Vero response to a cytotoxin of *Escherichia coli*. *Infect.Immun.* 18. 775-779. 1977
- 3) 福山正文 他：健康な家畜におけるVero毒素産生大腸菌（VTEC）の汚染状況、特にヤギからの本邦初分離について、*感染症雑誌* 68. 508-512. 1994
- 4) 仁科徳啓 他：動物および食肉における腸管出血性大腸菌分布 *日食微誌* 13. 199-204. 1997
- 5) 平田和則 他：家畜よりのVero毒素産生大腸菌の分離と分離菌の血清型とVero毒素 *感染症雑誌* 66. 950-955. 1992
- 6) 田中 博 他：家畜および愛玩動物からのVero毒素産生性大腸菌の分離 *感染症雑誌* 66. 448-445. 1992
- 7) Heuvelink A.E. et.al: Isolation and Characterization of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 strains from Dutch cattle and sheep. *J.Clin.Microbiol.* 36. 878-882. 1998

- 8) 福山正文 他：Vero毒素産生大腸菌（VTEC）感染症に関する研究 一鹿からの本菌分離について— *感染症雑誌* 73. 1140-1144. 1999
- 9) Francis D.H. et.al.: Infection of notobiotic pigs with and *Escherichia coli* O157:H7 strain associated with and out break of haemorrhagic colitis. *Infect. Immun.* 51. 953-956 1986
- 10) Beery J.T. et. al: Colonization of chicken cecae by *Escherichia coli* associated with haemorrhagic colitis. *Appl. Environ. Microbiol.* 49. 310-315 1985.
- 11) Shanks P.L. : An unusual condition affecting the digestive organs of the pig. *Vet. Rec.* 50. 356-358. 1938.