

# 薬剤耐性菌の浸淫実態解明に関する調査研究 (平成12年度～平成14年度)

齊藤志保子      八柳   潤      佐藤   晴美      伊藤   功\*

秋田県内における薬剤耐性菌の浸淫状況を把握するため、市販鶏肉のバンコマイシン耐性腸球菌 (VRE)、サルモネラ、カンピロバクター汚染調査を平成12年度～平成14年度に実施した。さらに、鶏肉から分離された株及び医療機関から分与された患者由来VRE、サルモネラ、カンピロバクター株について薬剤感受性試験を実施した。

鶏肉のVRE汚染調査では、タイ産鶏肉32検体中8検体 (25%) から高度耐性であるVanA型VREが検出された。平成12年度～平成14年度の県内のヒト由来VREにVanA型株は認められなかった。VanB型VREはヒトから検出されているが、鶏肉からは検出されなかった。

サルモネラは鶏肉127検体中23検体 (18.1%) から分離された。分離株中の耐性菌の割合は血清型により異なり、S. Typhimurium、S. Infantisにおける耐性菌の割合が高率であった。平成8年度～平成14年度に分離されたS. Typhimurium 27株 (ヒト由来23株、鶏肉由来4株) について検査したところ、平成11年以降のヒト由来15株中7株が多剤耐性で問題となっているS. Typhimurium DT104であることが確認された。

カンピロバクターの鶏肉からの分離状況は、国産鶏肉73検体中陽性54検体 (74.0%)、輸入鶏肉44検体中陽性4検体 (9.1%) であった。ニューキノロン剤多剤耐性菌がヒト由来株の30.2%、鶏肉由来株の37.4%に認められた。

キーワード：VRE、サルモネラ、カンピロバクター、薬剤耐性菌

## I はじめに

合成抗菌薬や抗生物質の発見により細菌感染症の治療は著しい進歩を遂げた。しかし、1980年代から薬剤耐性菌の出現が医療にとって大きな問題となっている。メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) やVRE等の院内感染菌、市中感染症であるペニシリン耐性肺炎球菌 (PRSP) やインフルエンザ菌、食中毒・散発下痢症の原因となるサルモネラやカンピロバクターなど感染症を引き起こす病原細菌のほとんどにおいて薬剤耐性が進行し、しかも多剤耐性や高度耐性を獲得した耐性菌が出現しつつある。これら各種の薬剤耐性菌やその感染症に対する適切な対応や対策を行うためにはその実態の把握が不可欠である。

県内においても、患者由来株については治療に際し必要な薬剤感受性試験は実施されているが、薬剤耐性菌全体の浸淫状況は把握されていない。また、食品などの生活環境内における耐性菌の汚染状況も不明であり、感染源・経路も検討されていない。このことから本調査では重要な院内感染起因菌であり、輸入鶏肉による感染事例も報告されているVRE、多剤耐性DT104 (definitive type 104) の出現が注視されているサルモネラ、下痢症

の治療に汎用されているニューキノロン剤に対する耐性菌の増加が懸念されているカンピロバクターについて、患者由来株の薬剤耐性の現状を把握するとともに市販鶏肉中の耐性菌の汚染実態を明らかにし、行政・医療機関などに情報提供することにより、耐性菌対策に資することを目的に調査を実施した。

## II 材料と方法

### 1. 鶏肉における汚染実態調査

#### 1) 材料

平成12年度～平成14年度に県内のスーパー等から購入した鶏肉を、VRE汚染実態調査には112検体 (国産50検体、輸入56検体、不明6検体)、サルモネラ汚染実態調査には127検体 (国産65検体、輸入56検体、不明6検体)、カンピロバクター汚染実態調査には122検体 (国産73検体、輸入44検体、不明5検体) 検査に供した。

#### 2) 検査方法

(1)VRE：鶏肉25gをBPW225mlに接種し、一夜培養後、バンコマイシン (6 µg/ml、32 µg/ml) 加EF平板及びm Enterococcus 平板に塗布し、発育

\* 脳血管研究センター

してきた疑わしいコロニーについて耐性試験等を行った。

(2)サルモネラ：肉25gをBPW225mlに接種し一夜培養後、ハーナーテトラチオン酸塩培地で増菌し、SS、DHL平板で分離培養した。

(3)カンピロバクター：鶏肉10gをプレストン培地100mlに接種し、42℃好気培養後、CCDA平板で分離培養した。

## 2. 分離株の薬剤感受性試験

### 1) 材料

(1)サルモネラ：平成12年度～平成14年度に患者及び鶏肉から分離されたS. Infantis 14株、S. Virchow 2株、S. Enteritidis 70株、S. Typhimurium 10株、計4血清型96株を検査に供した。また、S. Typhimurium DT104の浸淫状況を確認するため、平成8年度～平成14年度に分離された患者由来23株、鶏肉由来4株のS. typhimuriumを検査に供した。

(2)カンピロバクター：平成12年度～平成14年度に分離された散発下痢患者由来169株、鶏肉由来91株を検査に供した。

### 2) 検査方法

(1)サルモネラ：4血清型96株については栄研化学のドライプレート‘栄研’DP21を用い17種類の抗生

物質（表1）に対する感受性を検査した。また、S. typhimuriumについてはDT104 確認試験として、5種類の薬剤（表1）に対する感受性をディスク法で検査するとともにDT104の特異遺伝子をターゲットとしたPCR<sup>1)</sup>を行った。

(2)カンピロバクター：ニューキノロン剤等6種類に対する感受性をディスク法で検査した。

## 3. VRE分離株の耐性遺伝子を標的にしたPCRによる遺伝子診断法

### 1) 材料

平成12年度～14年度に医療機関で分離されたヒト由来43株、及び当所の汚染実態調査で分離された鶏肉由来8株を検査に供した。

### 2) 検査方法

VREはバンコマイシン、テイコプラニンに高度耐性を示すクラスA（vanA遺伝子保有）、バンコマイシンに高度耐性を示すがテイコプラニンには感受性を示すクラスB（VanB遺伝子保有）、バンコマイシンに中程度耐性を示すVanC（VanC<sub>1</sub>、VanC<sub>2,3</sub>遺伝子保有）などの種類に分けられる。VREのクラスを判定するため、耐性遺伝子VanA、VanB、VanC<sub>1</sub>、VanC<sub>2,3</sub>を標的にしたPCR<sup>2)</sup>を導入し、分離株について耐性遺伝子の検索を実施した。

表1 ドライプレートDP21の検査対象薬剤

ABPC	アンピシリンナトリウム
PIPC	ピペラシリンナトリウム
CEZ	セファゾリンナトリウム
CTM	塩酸セフォチアム
CAZ	セフトジウム
CCL	セファクロル
FMOX	フロモキシセフナトリウム
CPDX	セブポドキシムナトリウム
AZT	アズトレオナム
IPM	イムペネム
MEPM	メロペネム三水合物
GM	硫酸ゲンタマイシン
AMK	硫酸アミカシン
MINO	塩酸ミノサイクリン
FOM	ホスホマイシンナトリウム
LVFX	レボフロキサシン
ST	スルフォメトキサゾール/トリメトプリム
S. typhimurium のディスク法検査対象薬剤	
S	ストレプトマイシン
C	クロラムフェニコール
T	テトラサイクリン
G	スルフィソキサゾール
A	アンピシリン

## III 結果と考察

### 1. VRE

平成12年度～平成14年度に医療機関で分離されたヒト由来VRE43株についてPCRにより耐性遺伝子を検査したところ、VanA遺伝子を保有する株は確認されなかったが、バンコマイシン高度耐性のVanB遺伝子保有株は19株確認された（表2）。VanC遺伝子保有株も16株確認されたが、VanC型VREは耐性度が低いことから、院内感染対策上はさほど問題視されていない。鶏肉からのVRE分離成績はタイ産鶏肉32検体中8検体が陽性であったが、国産鶏肉50検体、タイ以外の輸入鶏肉24検体、産地不明6検体はすべて陰性であった（表3）。タイ産鶏肉から分離されたVREはすべてVanA遺伝子保有株であった。

VRE増加の背景としては、バンコマイシン類似物質のアボパルシンが鶏や豚の肥育促進剤として世界各地で使用され、鶏等の腸管内でVREが選択的に増加したことによると考えられている。フランス産、タイ産の鶏肉からのVRE検出例がいくつか報告されており<sup>3)</sup>、今回の当所の調査においてもタイ産鶏肉から高率にVREが検出されたが、これは欧州、東南アジアでアボパルシンが長期にわたり、また近年まで使用されてきたことによると考えられる。家禽のVRE保有率が高いことに加え

表2 ヒト由来VREのPCRによる耐性遺伝子成績

	検査件数	耐性遺伝子型					陰性
		VanA	VanB	VanC <sub>1</sub>	VanC <sub>2,3</sub>	VanC <sub>1</sub> /C <sub>2,3</sub>	
平成12年	22	0	5	7	6	1	3
平成13年	12	0	9	2	0	0	1
平成14年	9	0	5	0	1	0	3
計	43	0	19	9	7	1	7

表3 鶏肉からのVRE分離成績

産地別	平成12年		平成13年		平成14年		計	
	検体数	陽性数	検体数	陽性数	検体数	陽性数	検体数	陽性数
国内産	8	0	20	0	22	0	50	0
輸入(タイ不含)	9	0	7	0	8	0	24	0
タイ産	7	3 (VanA : 3)	13	2 (VanA : 2)	12	3 (VanA : 3)	32	8
不明	6	0	0	0	0	0	6	0
計	30	3	40	2	42	3	112	8

表4 鶏肉からのサルモネラ分離成績

産地別	平成12年			平成13年			平成14年			計	
	検体数	陽性数	血清型(株数)	検体数	陽性数	血清型(株数)	検体数	陽性数	血清型(株数)	検体数	陽性数
国内産	23	5	S.Schwarzengrund (1) S.Infantis (4)	20	3	S.Infantis (3)	22	3	S.Typhimurium (1) S.Infantis (1) Out(1)	65	11
輸入	16	4	S.Virchow (1) S.Enteritidis (3)	20	2	S.Enteritidis (2)	20	5	S.Enteritidis (2) S.Haardet (1) O8 (3)	56	11
不明	6	1	S.Haifa (1)	0	0		0	0		6	1
計	45	10		40	5		42	8		127	23

表5 ヒト及び鶏肉由来サルモネラ分離株の薬剤感受性試験結果(ドライプレートDP21)

血清型	由来	供試株数	耐性薬剤(株数)	耐性株計(%)	感受性株数(%)
S.Infantis	ヒト	6	ST (1), MINO (1)	2 (33.3)	4 (66.7)
	鶏肉	8	ST (3)	3 (37.5)	5 (62.5)
S.Virchow	ヒト	1	-		1
	鶏肉	1	-		1
S.Enteritidis	ヒト	63	MINO (2) ABPC/PIPC (1) ABPC/IPM (1) ABPC/MINO (1) CTM/FMOX/AZT/AMK (1) ABPC/CEZ/CTM/CAZ/CCL/CPDX/AZT/MINO (1)	7 (11.1)	56 (88.9)
	鶏肉	7	MINO (1)	1 (14.3)	6 (85.7)
S.Typhimurium	ヒト	9	MINO (2), ABPC/PIPC (3)	5 (55.6)	4 (44.4)
	鶏肉	1	ABPC/PIPC/FOM/ST (1)	1 (100)	0
計		96			77

て、患者の治療にバンコマイシン使用の歴史が古い欧州ではVREは重要な院内感染起因菌であり、健常者にも一定の割合で定着しているといわれている。国内ではまだ散発発生がほとんどであるが<sup>4,5)</sup>、VanBによる院内集団発生事例<sup>6)</sup>や輸入鶏肉との関連が遺伝子型から示唆されたVanA感染事例も報告されている<sup>7)</sup>。今後はVRE

汚染鶏肉等を介して国内にVREが侵入し一般健常者の腸管汚染レベルが上昇することを防止することが院内感染対策上重要であると考えられている。県内においてはまだヒト由来のVanA型VREは確認されていないが、県内において市販されているタイ産鶏肉から高率にVanA型VREが検出されたことから、院内及び市中における

VanA型VREの出現に警戒が必要と考えられる。

一方、県内のヒト由来株で多いVanB型VREについてはその汚染源が不明であることから、その究明が必要と考えられる。

## 2. サルモネラ

鶏肉におけるサルモネラの分離成績は国産鶏肉65検体中陽性11検体、輸入鶏肉56検体中陽性11検体、産地不明6検体中陽性1検体、計127検体中23検体が分離陽性であった。分離株の血清型についてみると国産鶏肉ではS. Infantis (8/11株)、輸入鶏肉ではS. Enteritidis (7/11株)の分離数が多く、主要菌型が異なっていた(表4)。

鶏肉とヒト由来の分離株についてドライプレートDP21を用いて薬剤感受性試験を行った結果(表5)、S. Infantis 14株中5株にSTあるいはMINOに対する耐性株が認められた。S. Virchow 2株(ヒト由来1株および鶏肉由来1株)は供試薬剤にすべて感受性であった。S. Enteritidis については、ヒト由来63株中7株に耐性がみられ、8剤に対する多剤耐性株も1株認められた。また、鶏肉由来7株中1株がMINOに耐性であった。S. Typhimurium はヒト由来9株中5株、鶏肉由来1株に耐性がみられ、いずれも多剤耐性株であった。血清型により分離株の耐性菌の占める割合はかなり異なり、S. Typhimuriumが

非常に高率であり、次いでS. Infantisが高率であった。

近年欧米では多剤耐性のS. Typhimurium DT104(ファージ型別法でdefinitive type 104に分類)の増加が大きな問題となっている<sup>8)</sup>。S. Typhimurium DT104はペニシリン、テトラサイクリン、クロラムフェニコール、ストレプトマイシン、サルファ剤等の各種の抗菌薬に耐性のことが多く、オランダではキノロン薬にも耐性を獲得した株が確認されている。アメリカではDT104による食中毒事例や食肉の汚染も報告されている。

県内におけるDT104の浸淫状況を確認するため平成8年度～平成14年度に秋田県内で分離されたS. Typhimurium 27株(ヒト由来23株、鶏肉由来4株)について検査したところ、平成11年以降のヒト由来分離株15株中7株がDT104であることが確認された(表6)。平成11年度に分離されたDT104のうち3株は家族内食中毒事例で分離された株であり、食品衛生上留意が必要と考えられる。また、DT104以外のS. Typhimurium においても多剤耐性株がみられ、耐性遺伝子の一部は伝達性R-プラスミドで他のサルモネラや大腸菌に伝達されるといわれており警戒が必要である。

サルモネラ感染症において初期の不適切な抗菌薬の使用により体内の菌が選択的に増え、重症化が促進される

表6 県内で分離されたS. Typhimuriumの薬剤感受性試験及びDT104確認用PCR結果

分離年	患者由来株				鶏肉由来株			
	菌株No	ディスク法	ドライプレート DP21	PCR	菌株No	ディスク法	ドライプレート DP21	PCR
平成8年度	Sa618	S/C/T	MINO	-	Sa577	S/C/T/A	ABPC/PIPC/MINO	-
	Sa623	S/C/T/G/A	ABPC/PIPC/MINO	-				
	Sa624	S/C/T/G/A	ABPC/PIPC/CEZ/MINO	-				
平成9年度	Sa653	C/T	感受性	-	Sa663	C/T/A	ABPC/MINO	-
	Sa656	C/T	感受性	-				
	Sa661	C/T/G/A	MINO	-	Sa664	C/T/A	ABPC/MINO	-
	Sa674	未検査	MINO	-				
平成10年度	Sa574	未検査	MINO	-				
平成11年度	Sa1032	S/C/T/G/A	ABPC/GM/MINO	-				
	Sa1040*	S/C/T/G/A	ABPC/PIPC	+				
	Sa1041*	S/C/T/G/A	ABPC/PIPC	+				
	Sa1042*	S/C/T/G/A	ABPC/PIPC	+				
	Sa1066	C/T/A	ABPC/MINO	-				
	Sa1070	S/C/T/G/A	ABPC/PIPC	+				
平成12年度	Sa1112	C/T	MINO	-				
	Sa1171	S/C/T	MINO	-				
	Sa1177	S/C	感受性	-				
	Sa1182	C	感受性	-				
平成13年度	Sa1239	S/C/T/G/A	ABPC/PIPC	+				
	Sa1283	S/C/T/G/A	ABPC/PIPC	+				
平成14年度	Sa1372	S/C/T/G/A	ABPC/PIPC	+	Sa1393	S/C	ABPC/PIPC/FOM/ST	-
	Sa1385	S/C	感受性	-				
	Sa1402	S/C	感受性	-				

\* 食中毒事例由来株

表7 鶏肉からのカンピロバクター分離状況

産地別	平成12年		平成13年		平成14年		計		
	検体数	陽性数	検体数	陽性数	検体数	陽性数	検体数	陽性数	%
国内産	31	28	20	11	22	15	73	54	74.0
輸入	4	1	20	1	20	2	44	4	9.1
不明	5	1	0	0	0	0	5	1	20.0
計	40	30	40	12	42	17	122	59	48.4

表8 C.jejuni 分離株の薬剤感受性試験結果

	散発患者由来株								鶏肉由来株							
	H12年		H13年		H14年		合計		H12年		H13年		H14年		合計	
	株数	%	株数	%	株数	%	株数	%	株数	%	株数	%	株数	%	株数	%
NA	1	1.3	0		2	5.3	3	1.8	1	2.2	0		3	12.0	4	4.4
EM	0		1	1.9	0		1	0.6	0		0		0		0	0.0
TC	18	23.1	17	32.1	10	26.3	45	26.6	11	24.4	3	14.3	4	16.0	18	19.8
NA/TC	0		1	1.9	1	2.6	2	1.2	2	4.4	0		1	4.0	3	3.3
NA/EC	0		0		0		0	0.0	0				1	4.0	1	1.1
EM/TC	3	3.8	2	3.8	0		5	3.0	0		0		0		0	0.0
NOR/OFX/CIP/NA	21	26.9	9	17.0	8	21.1	38	22.5	5	11.1	4	19.0	8	32.0	17	18.7
NOR/OFX/CIP/NA/TC	5	6.4	3	5.7	2	5.3	10	5.9	8	17.8	2	9.5	3	12.0	13	14.3
NOR/OFX/CIP/NA/EM/TC	0		0		1	2.6	1	0.6	0		1	4.8	0		1	1.1
NOR/OFX/CIP/NA/EM	0		0		1	2.6	1	0.6	0				0		0	0.0
NOR/OFX/CIP/EM/TC	1	1.3	0		0		1	0.6	0		3	14.3	0		3	3.3
ニューキノロン剤多剤耐性小計	27	34.6	12	22.6	12	31.6	51	30.2	13	28.9	10	47.6	11	44.0	34	37.4
感受性	29	37.2	20	37.7	13	34.2	62	36.7	18	40.0	8	38.1	5	20.0	31	34.1
合計	78		53		38		169	100.0	45		21		25		91	100.0

TC (テトラサイクリン)、EM (エリスロマイシン)、NA (ナリジクス酸)、NOR (ノフロキサソン)、OFX (オフロキサシン)、CIP (シプロフロキサソン)

危険性が指摘されていることから、最初に用いる抗菌薬の選択の重要性に併せて耐性菌の情報を関係機関に情報提供することが必要と考えられる。

### 3. カンピロバクター

鶏肉からの分離状況は、国産鶏肉73検体中陽性54 (74.0%)、輸入鶏肉44検体中陽性4 (9.1%)であった (表7)。輸入鶏肉に比べて国産鶏肉における汚染率が非常に高率であった。輸入鶏肉からの検出率が低い理由としては、農場の汚染状況や食鳥処理工程の違い、抗菌剤などの使用状況、輸送中の凍結温度・凍結期間、融解回数などが関係すると考えられるが詳細は不明である。

6種類の検査対象薬剤に対し、いずれかに耐性がみられた株はヒト由来株で63.3%、鶏肉由来株で65.9%と非常に高率であった。近年、ニューキノロン薬に対する耐性株の増加傾向が問題となっているが<sup>9)</sup>、当所の薬剤感受性試験においてもニューキノロン薬に対する多剤耐性株はヒト由来株で30.2%、鶏肉由来株で37.4% (表8)と高率であった。また、ヒト由来株と鶏肉由来株で耐性パターンが類似していた。このことは、鶏肉の高度なカンピロバクター汚染状況と共に、ヒトのカンピロバクター感染症の原因としての鶏肉の重要性を示唆しているものと考えられた。

治療に関しては、サルモネラ同様、不適切な薬剤の使用により重症化の危険性があると考えられた。

また、カンピロバクター・ジェジュニーの鑑別性状としてナリジクス酸に感受性であることが検査項目とされてきたが、ヒトおよび鶏肉由来株のほぼ4割がナリジクス酸耐性となり、鑑別性状検査項目としては不適当と考えられた。

以上本調査において、VRE、サルモネラ、カンピロバクターの耐性菌のヒトや鶏肉への高度な浸淫実態が明らかとなったが、今後もすべての菌において薬剤耐性が進行し、多剤耐性、高度耐性の方向に進むと考えられる。さらなる医療機関における薬剤耐性菌の動向監視強化、そして食品からの分離株における薬剤耐性菌の動向について検討が必要である。また各機関の情報交換が重要になってくると考えられる。

## IV まとめ

1. 平成12年度～平成14年度の県内のヒト由来VRE株に、VanA型は認められなかったが、VanB、VanC型が確認された。また、タイ産鶏肉からVanA型VREが検出された。

2. サルモネラは鶏肉の18.1%から分離された。国産鶏肉ではS.Infantis、輸入鶏肉ではS.Enteritidisの分離数が多かった。また、多剤耐性で問題となっているS.typhimurium DT104が県内に平成11年頃から浸淫していることが確認された。

3. カンピロバクターは国産鶏肉の74%、輸入鶏肉の9.1%から分離された。ニューキノロン薬に対する多剤耐性株はヒト由来株で30.2%、鶏肉由来株で37.4%確認された。

#### 文 献

- 1) Lori C. et al. Identification of DT104 and U302 Phage Types among Saimonella enterica Serotype Typhimurium Isolates by PCR. J. Clin. Microbiol., 2000 ; 38 : 3484-3488
- 2) Sylvie Dutka-Malen et al. Detection of glycopeptide resistance genotypes and identification of the species level. Microbiol. 1995 ; 33 : 24-27
- 3) 食肉より分離された腸球菌の高度バンコマイシン耐

性に関する調査、研究報告。病原微生物検出情報月報, 1999 ; 20 : 42

- 4) 今福裕司, 他. VanB型VREによる子宮頸癌術後骨盤内感染性膿瘍の1例. 感染症学雑誌, 1999 ; 73 : 473-476.
- 5) 小栗豊子, 他. 東日本における患者糞便内のバンコマイシン耐性 *Enterococcus* (VRE) の検出状況. 感染症学雑誌, 2001 ; 75 : 541-550.
- 6) 国内最初の VanB型VRE (*Enterococcus faecalis*) の集団発生. 病原微生物検出情報月報, 2001 ; 22 : 148
- 7) 国内で分離されるバンコマイシン耐性腸球菌の遺伝子型. 病原微生物検出情報月報, 2000 ; 21 : 248-249
- 8) Multidrug-Resistant Salmonella Serotype Typhimurium - United States, 1996. CDC MMWR 1997 ; 46 : 308-310
- 9) Smith KE. et al. Quinolone-resistant *Campylobacter jejuni* infections in Minnesota, 1992-1998. Investigation Team. N. Engl. J. Med. 1999 ; 340 : 1525-1532