

食品、環境水等由来大腸菌の薬剤感受性

阿波野祥司 山田亨 岩切章¹⁾ 大浦裕子²⁾

Drug susceptibility testing of *Escherichia coli* strains isolated from food, water, and like of the environment

Shoji AWANO, Tohru YAMADA, Akira IWAKIRI, Yuko OHURA

要旨

宮崎県内を流通する食品、環境水等から分離された大腸菌の薬剤感受性の解析を行った。その結果、最も耐性率の高い抗菌薬はアンピシリン(ABPC)であり、その中でも食鳥処理場排水由来株及び市販鶏肉由来株から高率に ABPC 耐性菌が検出された。また、第 3 世代セファロスポリン系薬に耐性の菌株については、基質特異性拡張型 β ラクタマーゼ(ESBL)及び AmpC 型 β ラクタマーゼ(AmpC)産生株の確認試験を実施した。その結果、ESBL 産生菌については食鳥処理場排水由来株、市販鶏肉由来株及びヒト糞便由来株から 11 株検出された。今回の調査から、私たちの身近な所にも薬剤耐性菌が広く分布していることが推測されたので、食品及び環境由来の耐性菌とヒト由来耐性菌との関連性についても調査が必要と考えられる。

キーワード： 薬剤感受性， ESBL 産生菌， フルオロキノロン耐性菌

はじめに

薬剤耐性菌は、院内感染又は抗菌薬投与中に発生する感染症の原因微生物として知られているが、耐性菌感染症は抗菌薬投与歴がない健常人でも発症することがある¹⁾。

2012 年の厚生労働省院内感染対策サーベイランス事業(JANIS)の情報によると、第 3 世代セファロスポリン系薬及びフルオロキノロン系薬の大腸菌耐性株が年々増加してきている。

また、近年では家畜から基質特異性拡張型 β ラクタマーゼ(Extended-spectrum β -lactamase;ESBL)を産生する大腸菌の分離や家禽における ESBL 産生菌以外の AmpC 型 β ラクタマーゼ(AmpC)産生菌の増加が報告されている²⁾³⁾⁴⁾。

このように、薬剤耐性菌の出現はヒトへの抗菌薬使用以外に農畜産物への抗菌薬の使用も原因があると考えられている⁵⁾⁶⁾。

そこで今回、食品、環境水、食中毒患者等から分離された大腸菌について、各種抗菌薬に対する感受性並びに ESBL 産生菌及び AmpC 産生菌の分布状況を調査したので報告する。

材料と方法

1 材料

平成 24 年度に当研究所に搬入された、79 検体(食品 29 検体、事業場排水 31 検体、井戸水等 12 検体、食中毒事件のヒト由来糞便 7 検体)から分離した大腸菌 184 株を検査材料とした。

2 薬剤感受性試験

本試験は米国臨床検査標準協会(Clinical and Laboratory Standards Institute;CLSI)M100-S 21 の勧告に準拠した市販の感受性ディスクを用

いて実施した。(K-B法)

供試薬剤は、アンピシリン(ABPC)、セフトロキシム・プロキシセチル(CPDX-PR)、セファゾリン(CEZ)、セフトキサシム(CTX)、セフトジジム(CAZ)、セフェピム(CFPM)、セフトメタゾール(CMZ)、アズトレオナム(AZT)、タゾバクタム・ピペラシリン(TAZ/PIPC)、アミカシン(AMK)、ゲンタマイシン(GM)、ミノサイクリン(MINO)、クロラムフェニコール(CP)、ホスホマイシン(FOM)、ナリジクス酸(NA)、レボフロキサシン(LVFX)及びスルファメトキサゾール・トリメトプリム(ST)の計18薬剤を使用した。

3 ESBL, AmpC 確認試験等

CLSI document(M100-S20)によるESBLの検査法(ディスク拡散法)に基づき、阻止円直径(mm)が、CPDX(≤17)、CAZ(≤22)、AZT(≤27)、CTX(≤27)、CTRX(≤25)のいずれかの条件を満たすときにESBL産生菌を疑い、確認試験は、Double Disk Synergy Test(DDST)を用い、クラブラン酸(AMPC/CVA)によって酵素活性が阻害されCAZまたはCTXの阻止円が単剤に比べクラブラン酸併用で、5mm以上阻止円の増強が起きたものをESBL産生菌とした。

ESBL産生菌と判定した菌株は、TEM型、SHV型、CTX-M-1 group、CTX-M-2 group及びCTX-M-9 groupのプライマーを用いてPCR法で耐性遺伝子の型別を実施した。

また、DDSTでESBL産生菌と判定されなかった菌株は、ボロン酸を用いたDDST(AmpC/ESBL鑑別ディスク)でAmpC産生菌の鑑別を行った。

ESBL産生菌、AmpC産生菌及びフルオロキノロン系薬剤(LVFX)耐性菌については、市販抗血清によるO血清型の確認と、下痢原性大腸菌(EHEC、ETEC、EIEC、EPEC、EAggEC)の病原因子の遺伝子確認も実施した。

結果

1 薬剤感受性試験

各抗菌薬の耐性率(%)は、高い順にABPC(29.9)、ST(19.6)、CEZ(16.8)、NA(14.7)、CPDX-PR(12.0)、CTX(12.0)、CTRX(11.4)、CP(10.6)、MINO(10.9)、CAZ(5.4)、LVFX(4.9)、AZT(3.8)、GM(2.2)、CFPM(1.1)、CMZ(1.1)、FOM(1.1)、P/T(0)、AMK(0)であった(表1)。

表1 薬剤感受性結果 耐性率(%)

薬剤名	ABPC	ST	CEZ	NA	CPDX-PR	CTX	CTRX	CP	MINO
耐性率	29.9	19.6	16.8	14.7	12.0	12.0	11.4	10.6	10.9

薬剤名	CAZ	LVFX	AZT	GM	CFPM	CMZ	FOM	P/T	AMK
耐性率	5.4	4.9	3.8	2.2	1.1	1.1	1.1	0	0

各検体毎の薬剤耐性率は、食鳥処理場排水由来株及び市販鶏肉由来株が高い傾向を示した。この中で、最も耐性率の高かったABPCで由来別の耐性率をみると、食鳥処理場排水由来株が50%と最も高く、次いで市販鶏肉由来株が40%で、その他の事業場排水及び市販野菜からはABPC耐性菌は検出されなかった(表2)。

表2 各検体毎の薬剤耐性率

検体名	薬剤耐性率(%)				
	ABPC	ST	CEZ	NA	LVFX
食鳥処理場排水	50.0	21.9	28.1	37.5	6.3
畜産排水	18.4	26.3	5.3	10.5	5.3
井戸水等	11.8	0.0	5.9	0.0	0.0
その他事業場排水	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
市販鶏肉	40.0	23.3	26.7	20.0	6.7
市販牛豚肉	17.1	5.3	2.9	8.6	5.3
市販野菜	0.0	20.0	0.0	0.0	0.0

すべての抗菌薬に感受性(Susceptible;S)を示す菌株は80株(43.5%)であり、それ以外の菌株は何らかの薬剤に対して耐性(Resistant;R)又は中間(Intermediate;I)を示した。耐性菌(R)の内訳は、1薬剤にのみ耐性(27.7%)、2~4薬剤に耐性(35.0%)、5~7薬剤に耐性(33.7%)、8~10薬剤に耐性(3.6%)であった。また、5薬剤以上に耐性を示す菌株の割合は、市販鶏肉(56.3%)、食鳥処理場排水(27.3%)、市販牛豚肉(20%)、畜産排水(11.8%)の順で高く、その他の事業場排水と市販野菜では認められなかった。

2 ESBL, AmpC 確認試験等

食鳥処理場排水等9検体から11株のESBL産生菌が検出され、その内訳は、食鳥処理場排水由来株3検体5株、市販鶏肉由来株2検体2株、食中毒(疑い)事例のヒト糞便由来株4検体4株であった。遺伝子型別は、食鳥処理場排水由来でTEM型1株、SHV型3株、CTX-M-9 group1株、市販鶏肉由来でSHV型2株、ヒト糞便由来ではTEM+CTX-M-1 group1株、CTX-M-9 group3株であった(表3)。

表3 各検体ごとのESBL遺伝子型別

	TEM	SHV	TEM+CTX-M1	CTX-M9
食鳥処理場排水	1	3		1
市販鶏肉		2		
ヒト糞便由来			1	3

AmpC 産生菌は、食鳥処理場排水由来と市販鶏肉由来からそれぞれ 2 検体 2 株の合計 4 株が検出された。

ESBL 産生菌及び AmpC 産生菌の血清型は、O6, O20, O55, O86a, O114 及び O166 が各 1 株ずつ、O25:2 株、OUT:7 株で血清型の偏りはみられなかった(表 4)。LVFX 耐性菌については、O1 及び O20 が各 1 株で、OUT:7 株であった。

下痢原性大腸菌遺伝子については、ESBL・AmpC 産生菌、LVFX 耐性菌のいずれからも検出されなかった。

表4 市販抗血清による血清型内訳

	検体数	血清型(件数)
TEM	1	O86a(1)
SHV	5	O20(1) O114(1) OUT(3)
TEM+CTX-M-1	1	OUT(1)
CTX-M-9	4	O25(1) O166(1) OUT(2)
AmpC産生菌	4	O6(1) O25(1) O55(1) OUT(1)
LVFX耐性菌	9	O1(1) O20(1) OUT(7)

4 考察

ABPC 耐性菌は、その他の事業場排水及び市販野菜からは検出されなかったが、食鳥処理場排水や市販鶏肉、井戸水等から検出されており、このことから、私たちの身近な所にも薬剤耐性菌が存在していることが推測された。JANIS の統計(2012)によると、ヒト患者由来 LVFX 耐性菌は 34.3%だが、今回の調査では 4.9%であった。調査した検体数が少なかった影響も考慮する必要があるが、ヒト患者由来株と環境由来株の間で耐性率に差がみられた。また、一般的に ESBL 産生菌は LVFX にも耐性を示すことが多いとされているが⁸⁾、今回分離した菌株はいずれも LVFX には感受性を示した。

ESBL 産生及び AmpC 産生菌が原因であるヒトの細菌感染症に対する第 1 選択薬はカルバペネム系薬剤であるが⁹⁾、今回分離した 15 株は、P/T,

AMK, FOM の各薬剤に対していずれも感受性があり、治療の際の抗菌薬選択の参考になると考えられる。

ESBL 産生菌の遺伝子型別では、食鳥処理場排水・市販鶏肉由来株とヒト由来株では耐性遺伝子型の違いがみられた。今後は更に検体数を増やして調査をしていく必要があると考えられる。

今回の調査では、下痢原性大腸菌遺伝子を保有している菌株は確認できなかったが、海外では ESBL を保有する EHEC O104 によるアウトブレイクも発生しているため、今後はさらに検体数を増やし、食品・環境由来の耐性菌とヒトの感染症由来耐性菌との関連性についても調査が必要と考えられる。

文献

- 1) 石井良和：家畜および食肉から分離される ESBL 産生菌, THE CHEMICAL TIMES, No2(通巻 216 号), 9-12, (2010)
- 2) 石畝史 他：福井県内における人及び鶏肉由来基質特異性 β ラクタマーゼ産生大腸菌の分子疫学的検討, 日獣会誌, 63, 883-887, (2010)
- 3) 麻生嶋七美 他：ウシ・ブタ, 市販鶏肉及びヒトから分離された基質特異性拡張型 β ラクタマーゼ産生大腸菌の性状解析, 日本食品微生物学会雑誌, 29(4), 215-220, (2012)
- 4) 下島優香子 他：食肉からの基質特異性拡張型 β ラクタマーゼ(ESBL)産生大腸菌の検出, 東京健安研セ年報, 62, 145-150, (2011)
- 5) 田村豊：動物用抗菌性物質と薬剤耐性菌ー最近の国際動向とわが国の対応ー, モダンメディア, 47, 219-226, (2001)
- 6) 浅井鉄夫：家畜を介した耐性菌汚染ー日本と世界・現状と対策, 臨床と微生物, vol37 No6, 635-639, (2010)
- 7) 国立感染症研究所細菌第 2 部：β-ラクタマーゼ遺伝子の検出法 (ESBL-SOP/ver3.0), (2007)
- 8) 村谷哲朗 他：基質特異性拡張型 β-lactamase 産生 Escherichia coli に対する各種抗菌薬の抗菌力, 日本化学療法学会雑誌, vol52 No10, 550-567, (2004)
- 9) 石井良和：基質特異性 β ラクタマーゼ(ESBL)産生菌, モダンメディア, 53, 8-14, (2007)