

イヌふん便からの薬剤耐性菌検出の試み

畠 山 薫, 奥 野 ル ミ, 遠 藤 美代子, 柳 川 義 勢

Attempt of Detection of Drug Resistant Bacteria from Canine Stools

Kaoru HATAKEYAMA, Rumi OKUNO, Miyoko ENDO and Yoshitoki YANAGAWA

イヌふん便からの薬剤耐性菌検出の試み

畠 山 薫*, 奥 野 ル ミ*, 遠 藤 美代子*, 柳 川 義 勢*

Attempt of Detection of Drug Resistant Bacteria from Canine Stools

Kaoru HATAKEYAMA*, Rumi OKUNO*, Miyoko ENDO* and Yoshitoki YANAGAWA*

Keywords : 薬剤耐性菌 drug resistant bacteria, メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, バンコマイシン耐性腸球菌 vancomycin resistant enterococci, 基質特異性拡張型 β ラクタマーゼ extended-spectrum β lactamase

はじめに

メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (methicillin -resistant *Staphylococcus aureus*, 以下MRSAと略す), バンコマイシン耐性腸球菌 (vancomycin resistant enterococci, 以下VREと略す), 基質特異性拡張型 β ラクタマーゼ (extended-spectrum β lactamase, 以下ESBLと略す) 産生菌は, ヒトの臨床分野で重要視されている薬剤耐性菌である。

これら薬剤耐性菌は, 健康者が感染しても健康上何ら問題を起ささないが, 慢性疾患で長期に渡って抗生物質の投与を受けているヒトや, 抵抗力の弱っているヒトが感染すると, 敗血症や髄膜炎などの重篤な症状を引き起こすことがあり, 病院や介護施設等で集団感染を起こす事例が毎年報告されている。

また, 海外ではこれらの菌の分離報告はヒトのみならず, 家畜やペットからの報告がされている。MRSAでは, 動物とヒトの相互感染事例¹⁾ や小動物病院内での院内感染事例²⁾ が報告されている。また, VREでは, イヌの膀胱炎からの検出³⁾ や糞便等からの検出報告がある³⁾。そして, ESBL産生菌に関しては, ウシ, ウマ等の家畜および肉製品の調査報告⁵⁻⁷⁾ やイヌからの検出報告⁸⁾ がされている。しかしながら, 国内では, これらの調査にあまり取り組まれていないのが実態である。そこで, 今回, ペットとしてヒトと密接な関係にある, イヌの糞便を対象に薬剤耐性菌の分布調査を試みたので報告する。

実験方法

1. 調査期間および検体

平成 17 年 4 月から平成 18 年 2 月の間に東京都動物愛護相談センターに収容されたイヌ 134 頭の糞便を検体とした。

2. 分離方法

MRSA は, 塩化ナトリウム濃度を 7.5%にした普通ブイヨン (栄研) に糞便を添加し, 37°C18 時間培養を行った。次いで, 培養液 1 滴をマンニット食塩培地 (以下 MSEY と

略す, 栄研化学) に塗布し, 37°C48 時間培養を行った。MSEY 上でレシチン反応を示した黄色集落を 4 集落釣菌し MRSA 確認試験を行った。

VRE は, 塩化ナトリウム濃度を 6.5%にした普通ブイヨン培地 (栄研化学) に糞便を添加し, 37°C18 時間増菌培養を行った。次いで, 培養液 1 滴をバンコマイシン (以下 VCM と略す) を 8 μ g/mL 加えたエンテロコッカセル培地 (BBL) に塗布し, 37°C48 時間培養を行った。培養後, 発育してきた集落をトリプトソイブイヨン (OXOID) に接種し, 45°C18 時間の発育試験を行った。

ESBL 産生菌の検出は, 糞便をセフトキシム(以下 CTX と略す) を 1 μ g/mL 加えたマッコンキー寒天培地 (栄研化学) に塗布し, 37°C18 時間培養を行った。培地に発育してきたコロニーについて, 生化学的性状試験により菌種の同定を行った。

3. MRSA確認試験

MRSA スクリーニング培地 (BBL) に塗布し, 37°C18 時間培養を行った。培養後, 培地に発育してきた菌をメチシリン耐性と判定し, 生化学的性状試験を行い黄色ブドウ球菌の同定を行った。

4. VCM耐性遺伝子検査法

45°C発育試験陽性の菌株は, 表1に示すプライマーを用いたPCR法により, VCM耐性遺伝子である *vanA* 遺伝子および *vanB* 遺伝子の検出を行った⁹⁾。

5. ESBL産生確認試験

1) 薬剤感受性試験

ダブルディスク法¹⁰⁾により薬剤感受性試験を行った。すなわち, Mac Farland 0.5 に調整した菌液をミュラーヒントン (以下 MH と略す) 寒天培地 (栄研化学) に塗布後, 図 1 の左図に示したようにアモキシシリン-クラブラン酸 (A/C) 20/10 μ g ディスクを平板中央に置き, 中央とのディスク間

* 東京都健康安全研究センター微生物部病原細菌研究科 169-0073 東京都新宿区百人町 3-24-1

* Tokyo Metropolitan Institute of Public Health
3-24-1, Hyakunin-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 169-0073 Japan

表 1. VREおよびESBL遺伝子検出用PCRプライマー

遺伝子	プライマー塩基配列		増幅サイズ (bp)
VRE ^a			
VanA	A1	5'-GGG AAA ACG ACA ATT GC-3'	732bp
	A2	5'-GTA CAA TGC GGC CGT TA-3'	
VanB	B1	5'-ATG GGA AGC CGA TAG TC-3'	635bp
	B2	5'-GAT TTC GTT CCT CGA CC-3'	
ESBL ^b			
TEM	T1	5'-CCG TGT CGC CCT TAT TCC-3'	824bp
	T2	5'-AGG CAC CTA TCT CAG CGA-3'	
SHV	S1	5'-ATT TGT CGC TTC TTT ACT CGC-3'	1,051bp
	S2	5'-TTT ATG GCG TTA CCT TTG ACC-3'	
CTX-M-1 (MEN)	M1	5'-CGG TGC TGA AGA AAA GTG-3'	393bp
	M2	5'-TAC CCA GCG TCA GAT TAC-3'	
CTX-M-2 (Toho-1)	Th1-1	5'-ACG CTA CCC CTG CTA TTT-3'	780bp
	Th1-2	5'-CCT TTC CGC CTT CTG CTC-3'	
CTX-M-9 (Toho-2)	Th2-1	5'-GCA GAT AAT ACG CAG GTG-3'	354bp
	Th2-2	5'-CGC CGT GGT GGT GTC TCT-3'	

a PCR反応は、94℃ 1分、54℃ 1分、72℃1分を30サイクル行なった。

b PCR反応は、94℃1分、53℃1分、72℃1分を30サイクル行なった。

表 2. イヌ糞便からの薬剤耐性菌検査成績

検体数	陽性検体数					
	MRSA	(%)	VRE	(%)	ESBL	(%)
134	0	—	0	—	1	(0.7%)

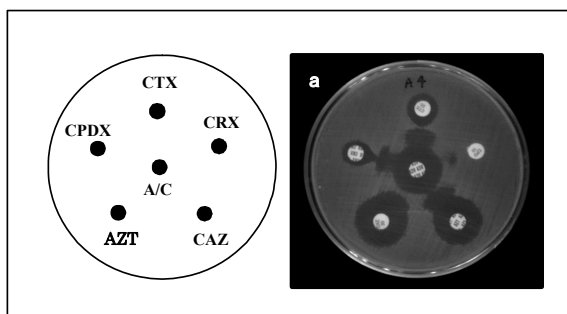


図1. ダブルディスク法

a: イヌから分離されたESBL産生*Escherichia coli*

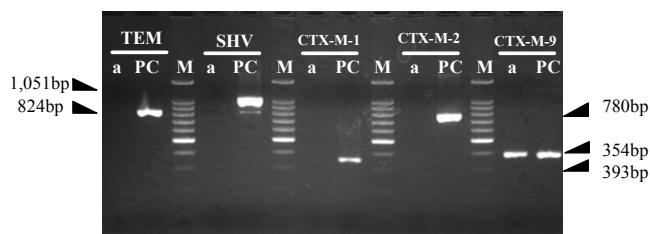


図2. PCR法によるESBL遺伝子の検出

a: イヌから分離されたESBL産生株

PC: 陽性コントロール, M: 100bp ラダーマーカー

距離を 25 mm 離して 5 方向にセフポドキシム (CPDX) 10 µg, セフトアジジム (CAZ) 30 µg, セフトリアキソン(CRX) 30 µg, アズトレオナム(AZT) 30 µg, セフォタキシム (CTX) 30 µg の各ディスクを置いた。37°C18 時間培養後、阻止円の形状を観察し、アモキシシリン-クラブラン酸と各薬剤の間に阻止円の増強(エッジの伸張等)が認められれば ESBL 産生菌と判定した(図 1・右図)。

2) プラスミド接合伝達試験

接合伝達試験は broth法¹⁰⁾ により行った。接合伝達株は *E.coli* Rif⁺ 株を使用した。方法は、被検株と接合伝達株をそれぞれ別々に Luria Bertani 培地(以下 LB と略す, Difco) で 37°C18 時間培養後、被検株を 10 µL, 接合伝達株を 90 µL 新たな LB に添加し、再び 37°C18 時間培養した。培養後、CTX を 2 µg/mL およびリファンピシン(以下 Rif と略す)を 500 mg/mL 添加した MH 寒天培地に塗布した。37°C18 時間培養後、CTX および Rif 添加 MH 寒天培地に接合伝達株が発育した被験株を R プラスミド伝達陽性株とした。

3) ESBL 遺伝子の型別

薬剤感受性試験およびプラスミド接合試験により ESBL 産生菌と判定された菌株は、表 1 に示すプライマー¹⁰⁾ を用いて ESBL 遺伝子の検出を行った。また、検出された遺伝子は、Ekertra らのプライマー¹¹⁾

M9 upper 5'-ATGGTGACAAAGAGAGTGCA-3'

M9 lower 5'-CCCTTCGGCGATGATTCTC-3'

の増幅産物を Applied biosystems sequencer (Model 310) を使用し、サンガー法¹²⁾ により塩基配列の解析を行った。

6. 大腸菌の病原遺伝子の確認

ESBL 産生が確認された *Escherichia coli* は、PCR 法により病原遺伝子の確認を行った¹³⁾。

結果および考察

1. MRSA 検出状況

134 検体中 MRSA の存在が疑われた 9 検体を MRSA 確認試験に供した。うち、1 件で MRSA スクリーニング培地に発育を認めた。しかしながら、生化学的性状試験によりこの株は、*S.intermedius* と同定された。最終成績として、134 検体のイヌ糞便からは MRSA は検出されなかった(表 2)。

2. VRE 検出状況

134 件中 33 件から腸球菌を検出した。これらの株を PCR 法により確認したが、*vanA* 遺伝子および *vanB* 遺伝子は検出されなかった(表 2)。

また、今回の調査と同時期にヒト下痢症患者および関係者 1,471 件について調査したが、VRE は検出されなかった。

Belkum ら³⁾ が、1996 年にオランダのイヌ、ネコ糞便を調査したところ、16% のイヌから VRE が検出されたと報告している。また、同地域の調査を Wagenvoort ら¹⁴⁾ が 2003 年に行ったところ VRE は検出されなかった。このこ

とは、VRE はその地域、時期により検出率に差があることを示している。このことから、動物やヒトにおける VRE の保菌状況については、今後も継続的にその動向を把握していく必要がある。

3. ESBL 産生菌の検出状況

CTX 添加培地を用いた分離培養において、糞便 134 件中 12 件で集落の発育が確認された。それらについて、薬剤感受性試験を実施した結果、1 株で図 1・右図のようにアモキシシリン-クラブラン酸薬剤ディスクと各薬剤ディスク間で、阻止円の増強を認めた。次いで、この株について、プラスミド接合試験を行ったところ、プラスミド伝達が認められたため、ESBL 産生株と判定した(表 2)。この ESBL 産生菌の菌種は、*Escherichia coli* であり、下痢原性大腸菌の病原遺伝子は保有していなかった。

この ESBL 産生菌について、PCR 法により ESBL 遺伝子検出を行った結果、CTX-M9 (Toho2) グループであった(図 2)。この CTX-M9 グループは、今回の調査と同時期に行ったヒト下痢症患者ならびに関係者の調査で分離された、ESBL 産生株で最も多いものであった¹⁰⁾。また、遺伝子解析により、分離された菌株の CTX-M タイプは CTX-M-14 型であった。

今回の調査と同じ時期の平成 17 年に行った、ヒト下痢症患者ならびに関係者糞便の調査では、2.1% から ESBL 産生菌が検出されており¹⁰⁾、それに比べ、イヌからの EBSL 産生菌検出は 0.7% と低い検出率であった。

海外では、福祉施設を訪問するボランティアに同行するイヌ等のペット動物に対しては、病原微生物の検査はもとより、MRSA, ESBL 等の耐性菌の検査も行われている¹⁵⁾。

今後、少子高齢化社会の中、ペットとヒトはより一層密接な関係になっていくことが考えられる。ペットにおける病原体保有調査は、病原微生物だけではなく薬剤耐性菌の検査も視野に入れ、ヒトの薬剤耐性菌感染を予防するために、その動向に注意すべきである。

ま と め

- 1) 今回の調査では、MRSA および *vanA* 遺伝子、*vanB* 遺伝子を保有した VRE は検出されなかった。
- 2) ESBL 産生菌は、1 件 1 株検出され、保菌率は 0.7% であった。
- 3) イヌ糞便より分離された ESBL 産生菌は CTX-M-9 グループであり、遺伝子型は CTX-M-14 型であった。

文 献

- 1) Loeffler, A., Boag, A., Sung, K., et al.: *J. Anti. Chemo.*, 56,692-697, 2005.
- 2) Strommenger, B., Kehrenerg, C., Kettiuz, C., et al.: *J.*

- Anti. Chemo.*, **57**, 461-465, 2006.
- 3) Belkum, A., Braak, N., Thomassen, R., *et al.*: *Lancet*, **348**, Oct.12, 1038-1039, 1996.
- 4) Simjee, S., White, D.G., McDermott, P.E., *et al.*: *J. Clin. Microbiol.*, **40**, 4659-4665, 2002.
- 5) Jensen, L., Hasman, H., Agerso, Y., *et al.*: *J. Anti. Chemo.*, **57**, 793-794, 2006.
- 6) Duan, R.S., Sit, T.H., Wang, S.S., *et al.*: *Microbiol. Drug Resist.*, **12**, 145-148, 2006.
- 7) Liebana, E.M., Batchelor, K., Hopkins, L., *et al.*: *J. Clin. Microbiol.*, **44**, 1630-1634, 2006.
- 8) Sidjabat, H.S., Hanson, N.D., Smith-Moland, E., *et al.*: *J. Med. Microbiol.*, **56**, 426-434, 2007.
- 9) Duka-malen, S., Evers, S., Courvalin, P.,: *J. Clin. Microbiol.*, **33**, 24-27, 1995.
- 10) 畠山 薫, 奥野ルミ, 遠藤美代子, 他: 東京健安研セ
年報, **57**, 69-72, 2006.
- 11) Echker, C., Gautier, V., Arlet, G., *et al.*: *J. Anti. Chemo.*, **57**, 14-23, 2006.
- 12) Sanger, T., Nicklen, S., Coulson, A.R.: *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **74**, 5463-5467, 1977.
- 13) 畠山 薫, 奥野ルミ, 小西典子, 他: 東京健安研セ
年報, **57**, 77-81, 2006.
- 14) Wagenvoort, J., Burgers, D., Wagenvoort, T., *et al.*: *J. Anti. Chemo.*, **52**, 532, 2003.
- 15) Lefebvre, S., Walter-Toews, D., Peregreie, A., *et al.*: *J. Hospital. Infect.*, **62**, 458-466, 2006.