

1 と畜場搬入家畜でのメチシリン耐性黄色ブドウ球菌保菌状況

坂上亜希恵、西村 肇

1. はじめに

メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*; MRSA) は院内感染の主要な起因菌であり、ヒト医療で重要視されている。近年では、従来の院内感染型 MRSA に加え、医療現場と接点のない市中から MRSA が分離されており、市中感染型 MRSA として注目されている。また、家畜由来薬剤耐性菌のヒト医療への影響が懸念されている。

一方、獣医療領域においても、MRSA の保菌や伝播は重要な問題であるが、国内での報告は少なく、まだ不明な点が多い。海外での報告によると、集約的に飼育されている家畜において MRSA の汚染率は高く、と畜場搬入動物や畜産業従事者及びと畜場作業員での高度の保菌率が問題視され、家畜や畜産業従事者のスクリーニングが推奨されている¹⁾。

所管すると畜場には東北全域から一日約 1000 頭の家畜が搬入されている。それらは臨床症状などを示していない健康畜として搬入されているため、野外株や常在菌のモニタリング対象として適していると考えられた。

そこで、MRSA をはじめとする薬剤耐性菌の家畜における状況を把握するため、と畜場に搬入された家畜における保菌状況を調査した。

2. 材料と方法

(1) サンプリング

2010 年の 7 月から 12 月にかけて、A 食肉センターに健康畜として搬入されたブタ (約 6 ヶ月齢) の両鼻腔から採取した鼻腔スワブ 200 サンプルを材料とした。

(2) 分離と菌種の同定

スワブを 5 ml の 6.5%NaCl 加ミューラーヒントンブイヨンに接種し、37°C48 時間増菌培養した。培養後に菌液を MRSA のスクリーニング培地である MSO 寒天培地 (日水製薬株式会社) に塗抹し、35°C48 時間分離培養した。マンニト分解及び卵黄反応陽性のコロニーを釣菌して 5%過酸化水素水に浸漬し、泡沫があればカタラーゼ陽性として 7.5%NaCl 加ハートインヒュージョン寒天培地で純培養した。その後、グラム染色とコアグララーゼ試験を行い、黄色ブドウ球菌の同定を行った。

(3) 表現型による MRSA 同定

センシ・ディスク (日本ベクトン・ディッキンソン株式会社) を用いてセフォキシチン (CFX) に対する感受性試験を行った。

(4) 遺伝子による MRSA 同定

メチシリン耐性遺伝子である *mecA*、黄色ブドウ球菌に特異的な遺伝子である *femA*、市中感染型 MRSA に関連した毒素遺伝子である *pvl* について Multiplex PCR による検出を行

った。PCR 反応は Phusion DNA Polymerase (サーモフィッシャーサイエンティフィック株式会社) を用いて、合計 50 μ l に調整した反応液 (1 \times HF PCR Buffer (containing 1.5 mM MgCl₂), 200 μ M dNTP mix, 200 nM 各プライマー, 1 μ l DNA 抽出液) を 98 $^{\circ}$ C 30 秒熱変性後、増幅反応 (98 $^{\circ}$ C 5 秒の熱変性、57 $^{\circ}$ C 10 秒のアニーリング及び 72 $^{\circ}$ C 10 秒の伸長反応) を 30 サイクル、72 $^{\circ}$ C 5 分で反応を終了し 4 $^{\circ}$ C で保存した。検出に用いたプライマーは表 1 に示した。

表 1 同定に用いたプライマー

標的領域	配列 (5'→3')	増幅産物 (bp)	引用文献
<i>mecA</i>	TGT CCG TAA CCT GAA TCA GC	519	[2]
	TGC TAT CCA CCC TCA AAC AG		
<i>femA</i>	AAC TGT TGG CCA CTA TGA GT	308	[3]
	CCA GCA TTA CCT GTA ATC TCG		
<i>pvl</i>	TCA TTA GGT AAA ATG TCT GGA CAT GAT CCA	433	[4]
	GCA TCA AST GTA TTG GAT AGC AAA AGC		

(5) 薬剤感受性試験

センシ・ディスクを用いて、Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) によるディスク法 (Kirby-Bauer 法) により薬剤感受性試験を行った。薬剤は、ベンジルペニシリン (PCG)、アンピシリン (ABPC)、セファゾリン (CEZ)、メロペネム (MEPM)、カナマイシン (KM)、エリスロマイシン (EM)、オキシテトラサイクリン (OTC)、クロラムフェニコール (CP)、ノルフロキサシン (NFLX)、リンコマイシン (LCM)、ST 合剤 (ST) の 11 種類を用いた。

3. 結果

(1) 黄色ブドウ球菌検出状況

調査は 30 農場から搬入されたブタ 200 頭について実施した。MSO 寒天培地では 200 検体中 26 株が分離され、うち 4 農場、5 株が黄色ブドウ球菌と同定された。

(2) MRSA 検出状況

黄色ブドウ球菌と同定された 5 株について検査を実施した。いずれの株も CFX 感受性であった。遺伝子検査においては *femA* が全ての株で検出されたのに対し、*mecA* および *pvl* は検出されなかった。これらより分離された株は MRSA ではないと判定した。

(3) 薬剤感受性試験

薬剤感受性試験の結果を表 2 に示した。黄色ブドウ球菌はすべての株が多剤耐性であり、耐性型は 3 剤から 6 剤耐性がみられ、2 株が同一の耐性パターンであった。PCG, ABPC, LCM にすべての株が耐性であった。

表2 黄色ブドウ球菌の耐性型

耐性薬剤数	耐性型	株数 (%)
6	PCG, ABPC, KM, EM, LCM, ST	1 (20)
5	PCG, ABPC, OTC, KM, LCM	1 (20)
4	PCG, ABPC, OTC, LCM	2 (40)
3	PCG, ABPC, LCM	1 (20)
合計		5 (100)

4. 考察

黄色ブドウ球菌は自然界に広く分布し、ヒト及び動物の皮膚や鼻腔内に常在している。ブタにおける黄色ブドウ球菌の鼻腔保菌率は85.3%という報告⁵⁾があるが、今回の調査では2.5%と低かった。これはMRSAスクリーニング培地による選択のためと考えられた。また、検出率に農場や季節による顕著な偏りはみられなかった。

薬剤感受性試験では、PCG, ABPC, LCM に全ての株が耐性であり、ついで OTC, KM, ST, EM と耐性率が高かった。セフェム系、カルバペネム系、CP、ニューキノロン系への耐性はみられなかった。これは家畜衛生分野における薬剤耐性モニタリング調査の報告⁶⁾と同様の傾向を示していた。

今回分離された黄色ブドウ球菌は、いずれも MRSA と判定されなかった。国内での他の調査によると、ブタでの MRSA 保菌率は0-0.9%^{7), 8)}、海外においてはブタの保菌率は高度であり、29-49%^{9), 10), 11)}との報告がある。本調査においても、ブタでの MRSA 保菌はみられなかったことから、これまでの報告と同様、国内におけるブタの MRSA 保菌状況は低度であることが明らかとなった。また、と畜場での保菌状況調査は家畜における薬剤耐性菌のスクリーニングとして有用であることが示唆された。加えて、分離された黄色ブドウ球菌がいずれも多剤耐性であったことから、家畜におけるさらなる保菌状況調査を行う必要があると思われた。

薬剤耐性菌はヒト、動物、環境などに使用される抗菌性物質の選択圧により出現するため、監視の継続、伝播経路や広がりへの理解、有効な感染制御法の研究が不可欠といわれている。今後は、ヒトでの院内感染対策に加えて、動物や環境から検出される耐性菌にも注目した総合的な対策が必要であるといえる。

参考文献

- 1) 国立医薬品食品衛生研究所.: 食品安全情報 (微生物) . 14 (2007).
- 2) Tsuchizaki N, J Ishikawa, and K Hotta.: Colony PCR for rapid detection of antibiotic resistance genes in MRSA and enterococci. Jpn J Antibiot. 53:422-429 (2000).
- 3) Paule SM, AC Pasquariello, DM Hacek, et al.: Direct detection of *Staphylococcus aureus* from adult and neonate nasal swab specimens using real-time polymerase chain

reaction. *J Mol Diagn.* 6:191-196 (2004).

4) Lina G, Y Piemont, F Godail-Gamot, et al.: Involvement of Panton-Valentine leukocidin-producing *Staphylococcus aureus* in primary skin infections and pneumonia. *Clin Infect Dis.* 29:1128-1132 (1999).

5) 森 實, 高橋 勉, 増田二郎他: 家鼠およびブタから分離されたブドウ球菌の生物学的性状, 薬剤感受性およびフェージ型について. *日細菌誌.* 25:1-9 (1970).

6) Morioka A, Asai T, Ishihara K, et al.: In vitro activity of 24 antimicrobial agents against *Staphylococcus* and *Streptococcus* isolated from diseased animals in Japan. *J Vet Med Sci.* 67:207-210 (2005).

7) 迫陽子, 小西拓也, 田畑光子他: とちく場搬入豚から分離した黄色ブドウ球菌の薬剤感受性について. *旭川市食肉衛生検査所事業概要.* 16-17 (2004).

8) Baba K, Ishihara K, Ozawa M, et al.: Isolation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) from swine in Japan. *Int J Antimicrob Agents.* 36:352-354 (2010).

9) De Neeling AJ, Van den Broek MJM, Spalburg EC, et al.: High prevalence of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in pigs. *Vet Microbiol.* 122:366-372 (2007).

10) Khanna T, Friendship R, Dewey C, et al.: Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* colonization in pigs and pig farmers. *Vet Microbiol.* 128:298-303 (2008).

11) Smith TC, Male MJ, Harper AL, et al.: Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain ST398 is present in Midwestern U.S. swine and swine workers. *PLoS One.* 4:e4258 (2008).