

動物および食肉由来メチシリン耐性ブドウ球菌

清水 晃(神戸大学農学部感染・免疫学教室)

はじめに

MRSA(methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*)はメチシリンが開発された翌年の1961年に英国で分離されており、1970年代には欧米諸国では難治性の院内感染の病原菌として問題にされてきたが、わが国では当時大腸菌、緑膿菌、クレブシエラ、セラチアなどのグラム陰性桿菌による感染症が優位であったためか、あまり問題にされていなかった。しかし、1980年代になって各種病巣から *S. aureus* の検出率が急速に増加しはじめ、それと並行するように、MRSAによる院内感染が増加しはじめた。この年代は第三世代のセフェム系薬剤が臨床応用された時期と一致する。またMRSAはメチシリンに代表される β -ラクタム剤(ペニシリン系とセフェム系の総称)に耐性であるのみならず、医学領域で汎用されている多くの抗菌薬にも耐性を示し、有効な治療薬が少ないため、治療上大きな困難をきたし、このMRSAによる院内感染が深刻な社会問題となっている。最近では、このメチシリン耐性株は *S. aureus* のみならず、*S. epidermidis* などのコアグララーゼ陰性ブドウ菌(CNS)にも広く存在していることが明らかにされ、院内感染の原因菌として注目されている。

一方獣医学領域では外国を含めて、牛の乳房炎乳汁、馬の子宮炎・創傷感染、動物病院の犬・猫からのMRSAの分離報告があるが、本菌の動物における検出状況についてはまだ十分な調査が行われていないのが現状である。従って、動物から分離されるMRSAの詳細な性状についての知見は極めて乏しい。

本シンポジウムでは多剤耐性を示すMRSAの特徴、耐性機構、感染症、治療、疫学、分離・同定法などについて概説し、次に動物におけるMRSA

研究の現状について紹介した。本稿では動物におけるMRSAとメチシリン耐性CNSの検出状況および薬剤耐性について、我々の研究室で得られた成績を中心に述べる。

1. 動物からのMRSAの検出状況

1) 牛

Devrieseら⁴⁾はベルギーの乳房炎乳汁より、68株のMRSAを分離し、これらの菌株はその生物学的性状から、ヒト由来のものであろうと推察した。わが国では、Matsunagaら⁸⁾、小川ら⁹⁾、安里²⁾が乳房炎乳汁より分離した、それぞれ46株(1988～1989年分離)、118株(1986～1989年)、95株(1986～1989年)について、薬剤感受性試験によりMRSAの検出を試みたが、すべて陰性であったと報告している。一方、早川ら(第118回日本獣医学会講演要旨集、1994年)は1993年に採取したバルク乳から、MRSAを検出している。

2) 馬

Anzaiら³⁾は1989～1991年に北海道日高地方の繁殖雌馬の子宮炎から15株のMRSAを分離し、すべてが *mecA* 遺伝子を保有し、メチシリン、セファゾリン(CEZ)、セファマンドール、セフゾナムなど多くの β -ラクタム剤に耐性で、テトラサイクリン(TC)、カナマイシン(KM)、ゲンタマイシン(GM)、エリスロマイシン(EM)、アミカシン(AMK)、ストレプトマイシン(SM)にも耐性を示す多剤耐性株であった。これらの菌株はすべてコアグララーゼIV型、ファージIII群、エンテロトキシンA型、TSST-1非産生の性状を示したことから、同一起源に由来することを示唆した。また彼らはMRSAの感染源を調べるために、1992年に1種馬場の環境材料、種雄馬、従業員の細菌検査を実施

し、種雄馬1頭の後肢繋部の皮膚病変部からMRSAを分離し、この菌株は子宮炎株の性状と一致した。我々¹⁴⁾は上記の16株について、パルスフィールドゲル電気泳動法(PFGE)を用いて遺伝学的近縁関係を調べ、遺伝子型からも同一クローンに由来することを確認した。次にこのMRSAがどこから馬あるいは牧場に侵入したのかを調べるために、同一表現型を示すヒト由来MRSAと比較したが、両者のPFGEパターンは異なっていた。

外国では、Hartmannら⁶⁾は外科手術後に創傷感染した1頭からMRSAを分離し、バンコマイシン(VCM)、クロラムフェニコール(CP)、シプロフロキサシン(CPFX)、エンロフロキサシン(ERFX)に感受性であったが、ペニシリン(PC)、オキサシリン(MPIPC)、セファロチン(CET)、GM、EM、スルファメトキサゾール・トリメトプリム(ST)に耐性を示し、この菌株はヒトから由来したものであろうと推察している。Seguinら¹³⁾も1993～1994年に大学獣医病院の11頭の病馬からMRSAを分離し、11株はVCM、CET、AMK、イミペネム(IPM)、クリンダマイシン(CLDM)、CPFXに感受性であったが、PC、MPIPC、アンピシリン(ABPC)、セフォキシチン、セフチオフル、GM、KM、EM、TC、STに耐性を示し、PFGE解析で馬株とヒト株のパターンが同一であったことから、伝播様式は不明であったが、感染源は獣医病院のスタッフであろうと述べている。

3) 豚

教室保存の扁桃(1986年分離、56株)と皮膚(1999年、5株)由来株を調べたが、MRSA株は検出されなかった。

4) 鶏

阿部ら¹⁾は食鳥処理場に出荷されたプロイラーの翼下皮膚から分離した132株(1981と1989年分離)について調べたが、MRSA株は検出されなかった。我々も、1970～1993年の間に、わが国と外国(英国、北アイルランド、ベルギー、ブルガリア、アルゼンチン)の病鶏、健康鶏から分離した511株について調べたが、全株がメチシリン感受性と判定された。

5) 犬・猫

1990年代に入ってから、犬・猫と病院環境にお

けるMRSA疫学調査が行われるようになり、表1に示すように、全体的にみると検出率はあまり高くないが、MRSAが分離されている。またMRSA以外に、*mecA*保有のメチシリン耐性の*S. epidermidis*、*S. sciuri*、*S. lentus*が分離されていることも注目されよう。

外国でもTomlinら¹⁵⁾が11頭の犬のMRSA感染症例を報告し、全株がメチシリン、MPIPCに耐性で、EM、CPFX、ERFXにも耐性を示す株があったが、VCMには感受性であった。Gortelら⁵⁾も犬の各種臨床材料から分離した株はPC、ABPC、MPIPC、CEZ、CLDM、EM、GMなど多くの薬剤に耐性を示し、また日本と同様に、*mecA*保有のメチシリン耐性の*S. epidermidis*、*S. hominis*、*S. haemolyticus*、*S. xylosus*も分離されている。猫では、病棟にいる猫がMRSAを保菌し、病棟内でのMRSAの蔓延に一役を買っていたという報告がある¹²⁾。

我々も1999年に神戸市内の動物病院の犬23頭と猫9頭の鼻腔・外耳・皮膚について、MRSAの保菌状況を調べたところ、1頭の犬の鼻腔から分離された。この菌株は*mecA*を保有し、昭和1濃度ディスクを用いた薬剤感受性試験では、MPIPC、CEZ、IPM、EM、TC、ミノサイクリン、KM、ノルフロキサシン、リンコマイシン(LCM)に耐性、ペニシリンG(PCG)、ABPC、セフメタゾール、CPLX、オフロキサシンに+感受性、ドキシサイクリン、GM、AMK、SM、VCMに+++感受性を示した。この菌株はコアグラゼII型、ファージIII群、エンテロトキシンC型、TSST-1を産生し、前述した馬MRSAとは異なった性状を示したが、興味深いことに韓国の犬MRSA¹¹⁾にも同じような表現型を示す菌株があり、現在遺伝子レベルでの比較解析を行っている(表2)。なおこの菌型は1990年代から、医学領域で全国的に流行しているものである。

6) 実験動物

教室保存のマウス腸管(1986年分離、48株)と皮膚(1999年、2株)由来株を調べたが、MRSA株は検出されなかった。

7) 肉類・魚類

1987～1988年に市販の鶏肉(102株)、豚肉(3株)、牛肉(6株)、魚類(19株)から分離した菌株

表1 わが国における犬と病院環境からのMRSAの検出状況

報告者	検査材料	分離
小山博之ら ^{a)} (1993)	外来患畜犬の鼻咽頭液 10頭 入院患畜犬の鼻咽頭液 10頭 臨床検査材料(猫を含む) 20例	計192株中にメチシリン耐性なし
村井則子ら ^{b)} (1995)	動物病院内の環境材料	72検体中3検体からMRSAを分離
大仲賢二ら ^{c)} (1995)	健康犬の咽頭ぬぐい液 38例中26例からブドウ球菌分離	<i>mecA</i> 保有株 <i>S. sciuri</i> 1株 <i>S. lentus</i> 1株 <i>S. aureus</i> 1株
鎌田 寛ら ^{d)} (1997)	動物病院内の環境 大学病院 開業病院	検出された <i>S. aureus</i> の中で、メチシリン、オキサシリン耐性 約40% (18株) 約60% (25株)
伊藤喜久治ら ^{e)} (1998)	患畜 15検体(犬14; 猫1) 健康犬の鼻腔 10頭 環境 10例	5検体からMRSAを分離 1頭からMRSAを分離 1例からMRSAを分離
永吉ちひろら ^{f)} (1999)	開業病院の臨床材料 大学病院の患畜	50株中4株から <i>mecA</i> 保有株を分離 <i>S. aureus</i> 2株 <i>S. lentus</i> 1株 <i>S. epidermidis</i> 1株
清水 晃ら (1999)	開業病院 犬 23頭 猫 9頭	犬1頭からMRSAを分離

a) 第116回, b) 第119回, c) 第120回, d) 第123回, e) 第125回, f) 第128回
日本獣医学会講演要旨集

表2 馬および犬由来MRSAの性状

分離年度	馬 (n=16)		犬		
	1989-1992	1999	日本 (n=1)	韓国 (n=12)	
			1998		
コアグラ-ゼ型	IV	II	I	II	III
エンテロトキシン型	A	C	-	C	B
TSSST-1産生	-	+	-	+	-
ファージ型	III群	III群	NT ^{a)}	III群とNT	III・雑群
アミノ配糖体系薬剤 ^{b)}	耐性	耐性	耐性	耐性	耐性

a) ファージ型別不能。 b) ストレプトマイシン, カナマイシン, ゲンタマイシン, アミカシン, トブラマイシンのいずれかに耐性

を調べたが、MRSA株は検出されなかった。

以上のように、ヒトに比べると動物からのMRSA検出率はあまり高くないと思われる。その理由については不明であるが、医学領域で汎用されている第三世代のセフェム系薬剤が獣医学領域で治療にあまり応用されていないことによると思われる。

2. 動物に病原性を示す *Staphylococcus intermedius* と *S. hyicus* のメチシリン耐性

教室で保存されていた健康・病犬由来 *S. intermedius* (1982～1985年分離, 28株; 1999年, 66株) と豚・鶏・牛由来 *S. hyicus* (1979～1984年, 212株) からはメチシリン耐性株は検出されなかった。しかし、外国では犬からメチシリン耐性の *S. intermedius* が分離されている⁵⁾。

3. 動物からのメチシリン耐性CNSの検出状況

メチシリン耐性は *S. aureus* 以外の菌種にも広く分布していることが明らかにされ、表3に示すように、現在までにヒトでは10菌種に *mecA* 保有のメチシリン耐性株が分離されており、*S. aureus* 以上にβ-ラクタム剤に対する耐性化が進んでいるといわれている。

mecA 遺伝子がどのような過程を経て、ブドウ球菌全体に拡散したのかについては、現在研究が進められているが、CNSから *S. aureus* に *mecA* が挿入されたという仮説をたてている研究者もいる。

1) 馬

1997年に近畿3県の8乗馬クラブ(兵庫県, 3; 大阪府, 3; 京都府, 2)所属の44頭中13頭(5クラブ)の鼻腔あるいは皮膚からメチシリン耐性菌を分離し、菌種は *S. epidermidis*, *S. lentus*, *S. xylo-sus*, *S. haemolyticus*, *S. saprophyticus*, *S. sciuri* で、いずれも *mecA* を保有し、*S. epidermidis* を除いて、*mecA* の制御系遺伝子である *mecI* と *mecR1* が検出されている。多くのβ-ラクタム剤とLCMに耐性で、これらに加えてEM, KM耐性を示す菌株もみられた。

また北海道日高地方の繁殖用軽種馬では、検査した15牧場100頭中7牧場13頭から分離され、菌種は *S. sciuri* (11頭) と *S. lentus* (3頭) で、いずれも *mecA*, *mecR1*, *mecI* 遺伝子が検出され、プロトタイプと考えられる菌株であった。ABPC, セフチゾキシム(CZX)に耐性を示す菌株が多かった。

2) 牛

北海道の3牧場で飼育されていた乳牛の鼻腔・乳頭皮膚について、1996年と1997年の2ヶ年にわたってメチシリン耐性ブドウ球菌の調査を行った。1996年度は45頭中22頭から分離され、菌種は *S. sciuri*, *S. lentus*, *S. saprophyticus*, *S. epidermidis* で、1997年度は51頭中11頭で、菌種は *S. sciuri* であった。これらの分離株はPCG, MPIP, クロキサシリン, ABPC, CEX, セファレキシン, LCMに耐性を示した。

3) 鶏

我々⁷⁾は1992年と1993年に、鶏の鼻腔・皮膚におけるMRSAの保菌状況を調査している中で、MRSA検出用のMS培地¹⁰⁾に発育する集落を見出した。目的とするMRSAは分離されなかったが、分離株を同定すると、*S. sciuri*, *S. saprophyticus*, *S. epidermidis* であり、メチシリンのMICは25～>100 μg/mlで、PCR法で *mecA* 遺伝子が検出され、動物にもMRSA以外にメチシリン耐性のブドウ球菌が存在していることを明らかにした。

これらの菌種の薬剤耐性を調べると、*S. sciuri* (3株)では、多くのペニシリン系とセフェム系の薬剤とTCに耐性を示し、*S. saprophyticus* (3株)では、ペニシリン系、セフェム系、TCに加えて、EM, LCM, CLDMにも耐性を示した。*S. epidermidis* (5株)では、薬剤耐性パターンが菌株によって異なっていたが、アミノ配糖体系のKM, GM, トブラマイシンに耐性を示した点が特徴的であった。

4) 食肉

1997年に札幌市、東京都、神戸市、福岡市で市販されていた食肉のメチシリン耐性ブドウ球菌の汚染調査を行い、鶏肉では4都市50検体中4都市27検体から分離され、菌種は *S. sciuri*, *S. lentus*, *S. haemolyticus*, *S. saprophyticus*, *S. cohnii* で、薬剤耐性パターンは菌種あるいは菌株によってまちまち

表3 ブドウ球菌菌種とメチシリン耐性の分布

	ヒト	動物	食肉
<i>S. aureus</i>	+	+(牛, 馬, 犬, 猫)	
<i>S. intermedius</i>		+(犬)	
<i>S. epidermidis</i>	+	+(鶏, 馬, 牛, 犬)	
<i>S. saprophyticus</i>	+	+(鶏, 馬, 牛)	+(鶏肉, 豚肉)
<i>S. haemolyticus</i>	+	+(馬, 犬)	+(鶏肉)
<i>S. simulans</i>	+		
<i>S. caprae</i>	+		
<i>S. capitis</i>	+		
<i>subsp. capitis</i>			
<i>S. hominis</i>	+	+(犬)	
<i>S. warneri</i>	+		
<i>S. sciuri</i>			
<i>subsp. sciuri</i>	+	+(鶏, 馬, 豚, 牛, 犬)	+(鶏肉, 豚肉)
<i>S. lentus</i>		+(馬, 牛, 犬)	+(鶏肉)
<i>S. cohnii</i>			+(鶏肉)
<i>S. xylosum</i>		+(馬, 牛, 犬)	

であったが、全体的にみると、PCG, MIPIC, CZX, LCM, IPM, KMに耐性を示す菌株が多かった。豚肉では4都市40検体中2都市3検体から分離され、菌種は*S. sciuri*, *S. saprophyticus*で、鶏肉とほぼ同様の薬剤に耐性を示した。

4. まとめ

動物におけるMRSAとメチシリン耐性CNSの検出状況および薬剤耐性について述べた。動物からのMRSA検出率はヒトに比べると高くはないが、動物由来MRSAも多くの薬剤に耐性を示している。

本稿で示したように、動物におけるMRSAの実態が少しずつ明らかにされてきているが、まだ不明な点も多くある。今後検討しなければならない課題としては、動物MRSAの全国的な実態調査、動物別の検出率の比較、生物学的・遺伝学的な側面からのヒトと動物MRSAの比較、外国で分離された動物MRSAとの比較などがあげられよう。

一方で、ヒトと同様に、動物にもメチシリン耐性のCNSが広く分布していること、食肉にも汚染が広がっていることが明らかにされ、また多剤耐性化が進んでいることから、これ以上メチシリン

耐性ブドウ球菌を増やさないためにも、無秩序な抗菌薬の使用は厳に慎むべきであろう。

文 献

- 1) 阿部伸司, 金井 久: 日獣会誌, 44, 104-107(1991)
- 2) 安里 章: 家畜診療, 351, 39-43(1992)
- 3) Anzai, T., Kamada, M., Kanemaru, T., et al.: J. Equine Sci., 7, 7-11(1996)
- 4) Devriese, L. A., and Hommez, J.: Res. Vet. Sci., 19, 23-27(1975)
- 5) Gortel, K., Campbell, K. L., Kakoma, I., et al.: Am. J. Vet. Res., 60, 1526-1530(1999)
- 6) Hartmann, F. A., Trostle, S. S., and Klohn, A. A. O.: J. Am. Vet. Med. Assoc., 211, 590-592(1997)
- 7) Kawano, J., Shimizu, A., Saitoh, Y., et al.: J. Clin. Microbiol., 34, 2072-2077(1996)
- 8) Matsunaga, T., Yoshida, T., Kamata, S., et al.: Jpn. J. Vet. Sci., 52, 1219-1227(1990)
- 9) 小川美敬, 遠藤俊夫: 日獣会誌, 44, 202-205(1991)
- 10) 大久保豊司, 岡本了一, 伊豫部志津子ほか: 臨床と微生物, 21, 355-358(1994)
- 11) Pak, S. -I., Han, H. -R., and Shimizu, A.: J. Vet. Med.

- Sci., 61, 1013-1018(1999)
- 12) Scott, G.M., Thomson, R., Malone-Lee, J., et al. : J. Hosp. Infect., 12, 29-34 (1988)
- 13) Seguin, J. C., Walker, R. D., Caron, J. P., et al. : J. Clin. Microbiol., 37, 1459-1463(1999)
- 14) Shimizu, A., Kawano, J., Yamamoto, C., et al. : J. Vet. Med. Sci., 59, 935-937(1997)
- 15) Tomlin, J., Peard, M. J., Lloyd, D. H., et al. : Vet. Rec., 144, 60-64(1999)

Isolation of MRSA and Methicillin-Resistant Coagulase-Negative Staphylococci from Animals in Japan

Akira SHIMIZU

Department of Microbiology and Immunology, Faculty of Agriculture, Kobe University,
1-1 Rokkodai-cho, Nada-ku, Kobe-shi, Hyogo 657-0013, Japan

Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) is one of the major agents of serious nosocomial infections in humans. Since it was first reported in England in 1961, the MRSA has been found in many countries, including Japan. The MRSA is clinically important because its cross-resistance to other β -lactam antibiotics, including cephalosporins. In addition, the MRSA has frequently showed resistance to many other antimicrobial agents except vancomycin.

Little is known about methicillin-resistant staphylococci in veterinary medicine. However, recently, MRSA strains have been isolated from mares with metritis, bulk milk, and clinical specimens obtained from dogs in Japan. Animal MRSA isolates are resistant to many β -lactam antibiotics, and some isolates are also resistant to macrolide and aminoglycoside antibiotics.

Other than MRSA isolates, isolates of coagulase-negative staphylococci (CNS) from apparently healthy chickens, horses and cows, such as *S. epidermidis*, *S. saprophyticus*, *S. haemolyticus*, *S. sciuri*, *S. lentus*, and *S. xylosum*, have been found to be methicillin resistant and to possess the *mecA* gene. Methicillin-resistant CNS isolates are highly resistant to many β -lactam antibiotics. Methicillin-resistant CNS strains have been also isolated from commercial raw chicken and pork samples.

討 論(座長：片岡 康，日獣畜大)

質問(松本修治，大日本製薬)

①韓国の動物病院の犬でMRSAがでているが，投薬の有無や使用薬剤名は。

②腸内の *E. coli* の様な常在菌において耐性菌は薬剤の選択圧が無くなれば減少・消失するが，MRSAの場合，薬剤の選択圧が無くなればどの様になるか。

答(清水 晃)

①投薬歴は不明。

②MRSAでも選択圧が消失すれば耐性菌は少なくなると思うが，あまりはっきりしない。

質問(高橋 勇，日獣大)

メチシリン耐性ブドウ球菌 (*S. aureus* にせよ，CNS にせよ) が馬からは割合よく検出されるが，牛の乳房炎からはあまり検出されないと聞いたが，その理由は

何故か。

答(清水 晃)

経験的、文献的にみても、馬からは割合よく分離される。馬では術後感染例からMRSAが分離されている。現在のところ、牛の乳房炎からあまり検出されていないが、その理由はよく分からない。

質問(小久江栄一, 農工大)

MRSAの病原性に関して、MRSAを腹腔内接種してもマウスは死なないと聞きますが。

答(清水 晃)

マウスを用いたMRSAとMSSAの比較実験(尾静脈接種)で、MRSA接種群の平均死亡率は13.3%、MSSA接種群では60.0%で、MRSAの方がMSSAよりも毒力が弱いという報告(第38回ブドウ球菌研究会)がある。

質問(鎌田 寛, 日本大)

①3% NaCl条件下で実験した理由。

②*mecA*の存在とPFGEの疫学調査。

③薬剤感受性の差(CP, TC)は*mecA*⁺株間でかなりあるか。

答(清水 晃)

①β-ラクタム剤に対する耐性はNaClの濃度依存性で、3%程度が最適である。

②*mecA*とPFGEパターンとの相関はみられない。またサザンハイブリダイゼーションによっても特定のバンドに偏ることもない。

③かなりある。

質問(片岡 康, 日獣大)

MRSAなどの多剤耐性菌を将来的にみて、どのように排除すべきか。

答(清水 晃)

大変難しい問題である。PBP2'という細胞壁合成酵素をブロックする薬、ワクチン開発など考えられるが、当面は抗生物質の乱用を避けるべきで、特に小動物領域では適正な使用が望まれる。