

ヒトとウシから分離された腸管出血性大腸菌 (EHEC) の 薬剤耐性状況の比較

阿部有利・渡部高貴・本田己喜子

福岡市保健環境研究所保健科学課

Comparison of Antimicrobial-Resistant Enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) Isolated from Humans and Cattles

Yuri ABE, Takaki WATANABE and Mikiko HONDA

Health Science Section, Fukuoka City Institute of Health and Environment

要約

2017～2018年度に福岡市内でヒトから分離されたヒト由来EHEC137株と福岡市食肉市場に搬入されたウシの直腸便から分離されたウシ由来 EHEC100 株を用いて、血清型別の分布状況の調査と14 薬剤の薬剤感受性試験を実施した。調査の結果、ヒトとウシでは分離された EHEC の血清型別の分布は異なっていた。2017 年度と 2018 年度にヒト及びウシ EHEC の両方で FOM 耐性株が 1 株ずつ検出され、2018 年度にウシ EHEC から第 3 世代及び第 4 世代セファロスポリン系薬剤に耐性を示す株が 2 株検出された。ヒトとウシの EHEC の薬剤耐性状況を比較した結果、薬剤耐性率はウシ由来 EHEC が高い傾向を示した。耐性率の高い薬剤の種類等は、ヒト由来 EHEC では年度により異なっていたが、ウシ由来 EHEC では年度による大きな違いはなかった。

Key Words : 腸管出血性大腸菌 enterohemorrhagic *Escherichia coli* , 薬剤耐性 Antimicrobial-Resistant, FOM 耐性株 FOM resistant strain, ウシ cattles

1 はじめに

腸管出血性大腸菌 (enterohemorrhagic *Escherichia coli* ; 以下、「EHEC」とする。) 感染症は、感染症法における全数報告対象の三類感染症であり、福岡市内でも毎年数十件の感染者が発生している。EHEC 感染症の治療については、抗菌薬投与の必要性について意見が分かっているものの、抗菌薬治療は選択肢の一つとなっている^{1, 2)}。近年、治療薬として用いられる薬剤に耐性を示す EHEC の検出が報告され、薬剤耐性株の増加が危惧されており^{3, 4)}、EHEC における薬剤耐性状況の実態を把握する必要性が増してきている。また、新規の抗微生物薬の開発は停滞している中、新たな薬剤耐性菌感染症の増加など今日の薬剤耐性問題の現状を受け、日本では 2016 年 4 月「薬剤耐性 (AMR) 対策アクションプラン」⁵⁾ が策定された。その中の戦略や具体的取組として「ヒト、動物、食品、環境等に関する統合的なワンヘルス動

向調査の実施」や「公衆衛生・動物衛生検査機関における薬剤耐性情報収集・提供機能の強化」など地方衛生研究所として関与すべき項目が挙げられている。

福岡市保健環境研究所ではこれまでに過去 11 年間 (2006～2016 年) に福岡市内でヒトから分離された EHEC について薬剤感受性試験を実施し、薬剤耐性化の現状と経時的傾向について調査した⁶⁾。また、EHEC を保菌しており EHEC 感染症の感染源として重要視されるウシについて、直腸便から分離した EHEC の薬剤感受性試験を実施し、ヒトとウシの EHEC の薬剤耐性状況を比較した。その結果、耐性を示す薬剤の種類と耐性率の高い薬剤の種類に類似傾向がみられ、両者の関連性が示唆された。しかしながらウシ EHEC に関しては単年の調査であり、検体数も少ないため単純に比較はできず、今回、継続して両者の血清型別の分布状況及び薬剤耐性状況について調査したので報告する。

2 実験方法

2.1 ヒト由来 EHEC の薬剤感受性試験

2.1.1 供試菌株

2017~2018 年度に当所に搬入及び当所で分離されたヒト由来の EHEC137 株 (2017 年度 : 82 株, 2018 年度 : 55 株) を用い, 薬剤感受性試験を行った。

2.1.2 薬剤感受性試験

薬剤感受性試験は臨床・検査標準協会 (Clinical and Laboratory Standards Institute ; CLSI) の実施基準⁷⁾ に従い, Kirby-Bauer 法により市販の感受性ディスク (センシ・ディスク ; 日本 BD) を用いて実施した。

供試薬剤として, アンピシリン (ABPC), セファロチン (CET), セフォチアム (CTM), セフトラジジム (CAZ), セフトキシム (CTX), セフェピム (CFPM), ノルフロキサシン (NFLX), テトラサイクリン (TC), ストレプトマイシン (SM), カナマイシン (KM), クロラムフェニコール (CP), ホスホマイシン (FOM), イミペネム (IPM) 及びメロペネム (MEPM) の計 14 薬剤を使用した。これら 14 薬剤のいずれか一つにでも耐性を示すものを薬剤耐性株として扱い, 薬剤耐性率は集団発生事例については代表株を用いて算出した。集団発生事例の代表株は薬剤耐性パターンが同一事例内で異なる場合, 一番多くの耐性を示す株を代表株とした。

2.2 ウシからの EHEC 分離

2017~2018 年度に福岡市食肉市場に搬入されたウシ 200 頭 (2017 年度 : 100 頭, 2018 年度 : 100 頭) を対象とした。

検体は直腸便を肛門から滅菌スワブを用いて採取した。滅菌スワブ検体を TSB 培地 10ml に接種し, 37°C, 18~24 時間増菌培養後, アルカリ熱抽出法により DNA を抽出した。スクリーニング検査として PCR 法によるベロ毒素 (VT) 遺伝子の検査を行い, VT 遺伝子陽性となった検体についてクロモアガー STEC (関東化学), 及び CT 選択剤 (セフィキシム・亜テルル酸カリウム) を除いたクロモアガー STEC (CT(-)STEC) に接種し, 37°C, 18~24 時間培養した。EHEC を疑うコロニーを釣菌し, TSI 培地, LIM 培地, シモンズ・クエン酸塩培地, 標準寒天培地に接種し, 37°C, 18~24 時間培養後, 生化学性状を確認するとともに病原大腸菌免疫血清 (デンカ生研) を用いて血清型別検査及び PCR 法による VT 遺伝子確認を行った。大腸菌と同定され VT 遺伝子が検出されたものを EHEC と同定した。

2.3 ウシ由来 EHEC の薬剤感受性試験

ウシ直腸便から分離された EHEC100 株を用いて, ヒト由来 EHEC と同方法にて薬剤感受性試験を実施した。

3 結果

3.1 ヒト由来 EHEC の薬剤感受性試験

3.1.1 分離菌株の血清型別

2017~2018 年度に分離されたヒト EHEC 菌株の血清型別の内訳を図 1 に示す。

2017 年度は O26 が 27 株 (32.9%), O157 が 22 株 (26.8%), O103 が 21 株 (25.6%), O91・O115・O121 が各 3 株 (3.7%), O5・O145・型別不能 (以下 ; 「OUT」とする。) が各 1 株 (1.2%) であった。また, O26 と O103 については各 1 件ずつ集団発生事例があり, 事例数では O157 が 17 件 (44.7%), O26 が 7 件 (18.4%), O103 が 3 件 (7.9%) の順に多かった。

2018 年度は O157 が 36 株 (65.5%), O26 が 10 株 (18.2%), O121 が 4 株 (7.3%), O5・O103・O111・O115・O185 が各 1 株 (1.8%) であった。事例数では O157 が 28 件 (65.1%), O26 が 6 件 (14.0%), O121 が 4 件 (9.3%) の順に多かった。

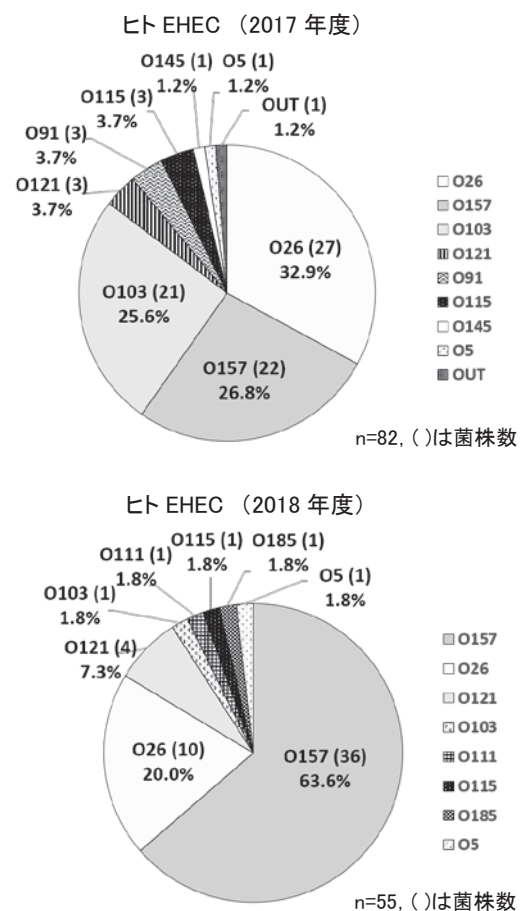


図 1 ヒト EHEC 分離菌株の血清型別の内訳

3.1.2 ヒト由来 EHEC の薬剤感受性試験

福岡市で分離されたヒト由来 EHEC137 株のうち、集団発生事例では代表株を用いた 103 株 (2017 年度: 48 株, 2018 年度: 55 株) についての薬剤感受性試験の結果を表 1 に示す。2017 年度は 48 株中 25 株 (52.1%), 2018 年度は 55 株中 15 株 (27.3%) が 14 薬剤のうちいずれか 1 種類以上の薬剤に耐性を示した。

薬剤別の耐性率は、2017 年度は ABPC 18 株 (37.5%), CET・TC・SM 各 5 株 (10.4%) の順に高く、2018 年度は CP 6 株 (10.9%), SM 5 株 (9.1%), ABPC 4 株 (7.3%) の順に高かった。

薬剤耐性パターン別に見ると、2017 年度は 14 薬剤全てに感受性を示したものが 23 株 (47.9%), 1 剤耐性が 16 株 (33.3%), 2 剤耐性が 5 株 (10.4%), 3 剤耐性と 4 剤耐性が各 2 株 (4.2%) であった。2018 年度は 14 薬剤全てに感受性を示したものが 40 株 (72.7%), 1 剤耐性が 14 株 (25.5%), 4 剤耐性が 1 株 (1.8%) であった (表 2)。また、FOM 耐性株が 2017 年度及び 2018 年度に 1 株ずつ検出された。

表 2 ヒト EHEC 分離菌株の薬剤耐性パターン

耐性薬剤数	耐性薬剤名	分離年度	
		2017	2018
1剤耐性	ABPC	9	3
	TC	2	
	SM	2	4
	CP	2	6
	CET	1	
	FOM		1
2剤耐性	ABPC, CET	3	
	ABPC, SM	1	
	ABPC, CP	1	
3剤耐性	ABPC, CET, TC	1	
	ABPC, CP, FOM	1	
4剤耐性	ABPC, TC, SM, KM	2	1
なし		23	40
計 (株数)		48	55

3.2 ウシからの EHEC 分離

3.2.1 分離菌株の血清型別

2017~2018 年度に福岡市食肉市場に搬入されたウシの直腸便 200 検体から 75 検体 100 株 (2017 年度: 39 株, 2018 年度: 61 株) の EHEC を分離した。分離菌株の血清型別の内訳を図 2 に示す。

2017 年度は OUT が 36 株 (92.3%), O157・O136・O6 が各 1 株 (2.6%) で、2018 年度は OUT が 59 株 (96.7%), O8・O115 が各 1 株 (1.6%) であり、OUT が分離菌株の大半を占めた。

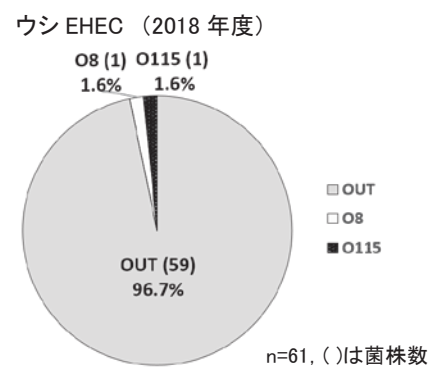
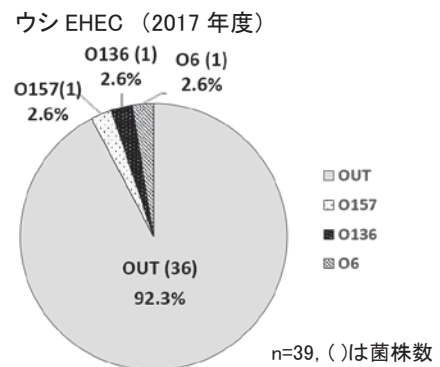


図 2 ウシ EHEC 分離菌株の血清型別の内訳

表 1 ヒト EHEC 菌株の薬剤感受性試験結果

供試薬剤	ABPC	CET	CTM	CAZ	CTX	CFPM	NFLX	TC	SM	KM	CP	FOM	MEPM	IPM
2017年度 耐性株数	18	5	0	0	0	0	0	5	5	2	4	1	0	0
(n=48) 耐性率(%)	37.5	10.4	0	0	0	0	0	10.4	10.4	4.2	8.3	2.1	0	0
2018年度 耐性株数	4	0	0	0	0	0	0	1	5	1	6	1	0	0
(n=55) 耐性率(%)	7.3	0	0	0	0	0	0	1.8	9.1	1.8	10.9	1.8	0	0

表 3 ウシ EHEC 菌株の薬剤感受性試験結果

供試薬剤	ABPC	CET	CTM	CAZ	CTX	CFPM	NFLX	TC	SM	KM	CP	FOM	MEPM	IPM
2017年度 耐性株数	13	6	0	0	0	0	0	11	9	3	5	1	0	0
(n=39) 耐性率(%)	33.3	15.4	0	0	0	0	0	28.2	23.1	7.7	12.8	2.6	0	0
2018年度 耐性株数	9	8	2	0	2	2	0	16	14	3	2	1	0	0
(n=61) 耐性率(%)	14.8	13.1	3.3	0	3.3	3.3	0	26.2	23.0	4.9	3.3	1.6	0	0

3.3 ウシ由来 EHEC の薬剤感受性試験

ウシ由来 EHEC100 株 (2017 年度 : 39 株, 2018 年度 : 61 株) の薬剤感受性試験の結果を表 3 に示す. 2017 年度は 39 株中 20 株 (51.3%), 2018 年度は 61 株中 28 株 (45.9%) が 14 薬剤のうちいずれか 1 種類以上の薬剤に耐性を示した.

薬剤別の耐性率は, 2017 年度は ABPC 13 株 (33.3%), TC 11 株 (28.2%), SM 9 株 (23.1%) の順に高く, 2018 年度は TC 16 株 (26.2%), SM 14 株 (23.0%), ABPC 9 株 (14.8%) の順に高かった.

薬剤耐性パターン別に見ると, 2017 年度は 14 薬剤全てに感受性を示したものが 19 株 (48.7%), 1 剤耐性が 6 株 (15.4%), 2 剤耐性が 9 株 (23.1%), 3 剤耐性と 4 剤耐性及び 5 剤耐性が各 1 株 (2.6%), 6 剤耐性が 2 株 (5.1%) であった. 2018 年度は 14 薬剤全てに感受性を示したものが 33 株 (54.1%), 1 剤耐性が 14 株 (23.0%), 2 剤耐性が 8 株 (13.1%), 3 剤耐性が 3 株 (4.9%), 4 剤耐性が 1 株 (1.6%), 8 剤耐性が 2 株 (3.3%) であった (表 4).

また, 2018 年度には第 3 世代セファロスポリン系薬剤の CTX 及び第 4 世代セファロスポリン系薬剤の CFPM に耐性を示す株が 2 株検出され, FOM 耐性株が 2017 年度及び 2018 年度に 1 株ずつ検出された.

表 4 ウシ EHEC 分離菌株の薬剤耐性パターン

耐性薬剤数	耐性薬剤名	分離年度	
		2017	2018
1剤耐性	ABPC	4	5
	TC	1	2
	CP	1	
	CET		4
	SM		2
	FOM		1
	2剤耐性	ABPC, CET	3
ABPC, FOM		1	
3剤耐性	TC, SM	5	8
	ABPC, TC, CP	1	
4剤耐性	ABPC, TC, SM		2
	CET, TC, SM		1
5剤耐性	ABPC, CET, TC, SM	1	
	CET, TC, SM, KM		1
6剤耐性	ABPC, TC, SM, KM, CP	1	
8剤耐性	ABPC, CET, CTM, CTX, CFPM, TC, KM, CP		2
なし		19	33
計 (株数)		39	61

3.4 ヒトとウシの EHEC の薬剤耐性状況の比較

ヒトとウシの EHEC の薬剤耐性状況を年次比較した結果を図 3 に示す. 薬剤耐性率は, ウシ由来 EHEC が高い傾向を示した. 耐性率の高い薬剤の種類は, ヒト由来

EHEC では年度により異なっていたが, ウシ由来 EHEC では両年度ともに TC, SM, ABPC に高い耐性率を示し, 年度による大きな違いはなかった.

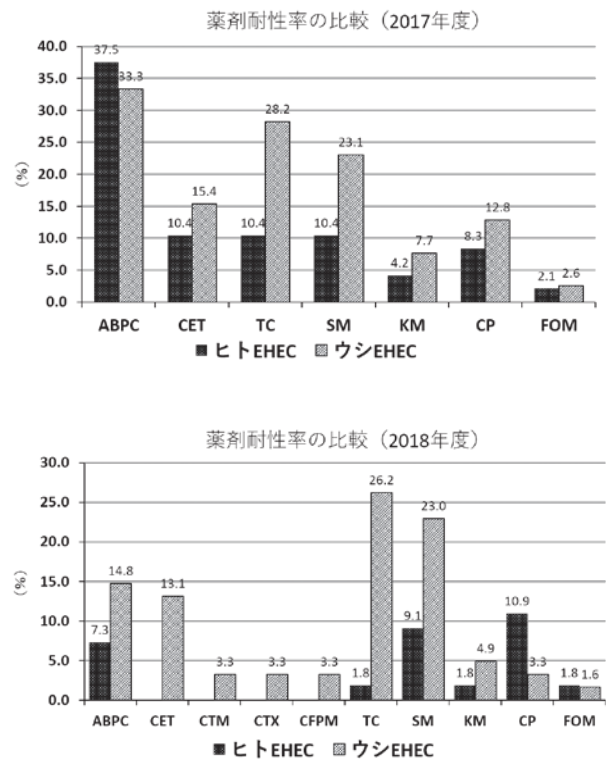


図 3 ヒトとウシの EHEC の薬剤耐性状況 (年次比較)

4 考察

福岡市内で分離されたヒト由来 EHEC の血清型別の分布状況は, 2017 年度は検出数では O26, O157, O103 の順に, 事例数では O157, O26, O103 の順に高い割合を示していたが, 2018 年度は検出数, 事例数ともに O157, O26, O121 の順に高い割合を示した. 2017 年度は O26 と O103 の集団発生事例が 1 事例ずつあったため, それぞれの検出数の割合が高くなっているが, 事例数では 2017 年度, 2018 年度ともに全国の統計とほぼ同様の傾向であった^{8, 9)}.

一方, 今回分離されたウシ由来 EHEC の血清型別の分布状況は 2017 年度, 2018 年度ともに 90%以上が OUT であった. これは吉田らや和田らの報告^{10, 11)}でウシから分離された EHEC の血清型の大半が OUT であったという結果と同じ傾向を示した. また, 牛肉類から分離された EHEC について血清型の半数以上が OUT であったという報告¹²⁾もあり, ウシが保菌している EHEC の大半が OUT であることが推測された. しかし, ヒトから分離された EHEC とは血清型別の分布が異なることが

ら、ウシが保菌している EHEC の全てがヒトへの感染源となるのではなく、腸管付着に關与する病原遺伝子 (*eae*, *aggR*, *astA*, *bfpA*) などを保有した一部の菌が感染に關与しているのではないかと推測された。

ヒト由来 EHEC の薬剤別の耐性率は、分離年度により耐性率の高い薬剤の種類及び耐性率は異なる傾向を示したが、ウシ由来 EHEC では、耐性率の高い薬剤の種類及び耐性率について年度による大きな違いはみられず、農林水産省の動物由来薬剤耐性菌モニタリング (JVARM)¹³⁾ の大腸菌の結果とほぼ同じ傾向であった。

薬剤耐性対策アクションプランではヒトに関する成果指標として、特定の耐性菌の分離率を設定しているが、大腸菌についてはカルバペネム系薬剤の IPM 及び MEPM 耐性率は 2017 年は 0.1% と低い水準で維持されており、2020 年の目標値は 0.2% 以下とされている。また、フルオロキノロン耐性率は 2017 年は 40.1% で若干の増加傾向にあるが、2020 年には 25% 以下を目標値としている¹³⁾。今回の調査において、ヒト由来 EHEC から IPM, MEPM 及びフルオロキノロン系薬剤である NFLX の耐性菌はいずれも検出されなかった。また、厚生労働省の院内感染対策サーベイランス事業 (JANIS) の調査では、大腸菌において重点的な対策が必要とされる第 3 世代セファロスポリン系薬剤、フルオロキノロン系薬剤への耐性率は増加傾向にあるが、当所での EHEC の調査では耐性率は低く増加傾向もみられず、重点的な対策が必要な薬剤の耐性菌は検出されなかった。

同アクションプランの動物に関する成果指標では、大腸菌における 2020 年の目標値は TC 耐性率 33% 以下、第 3 世代セファロスポリン及びフルオロキノロン耐性率は G7 各国の数値と同水準と設定されている¹³⁾。今回の調査で分離されたウシ EHEC の TC 耐性率は 2017 年度が 28.2%、2018 年度が 26.2% といずれも 2020 年の目標値を下回る水準であった。また第 3 世代セファロスポリン系薬剤の CTX 及び第 4 世代セファロスポリン系薬剤の CFPM への耐性菌が 2018 年度に 2 株検出 (3.3%) されたが、フルオロキノロン系薬剤である NFLX の耐性菌は検出されず、今回の調査ではヒトとウシ EHEC の薬剤耐性率が増加する傾向はみられなかった。

一方、EHEC 感染者に対する治療は保存的治療が中心であるが、保菌者の周囲に感染時のリスクが高い乳幼児や高齢者がいる場合などでは感染拡大防止の目的で抗菌剤の使用が考慮されており、その主要薬剤として FOM が使用されている¹⁴⁾。しかし、FOM 耐性菌検出の報告¹⁵⁾もあり、今回の調査においても、2017 年度と 2018 年度にヒト及びウシ由来 EHEC の両方から、FOM 耐性株が 1 株ずつ検出された。このことから、福岡市において今後も FOM 耐性菌等の薬剤耐性状況を注視する必要

があると考えられた。

今回の調査の結果、ヒトとウシから分離された EHEC は血清型別の分布状況は異なっており、薬剤耐性状況に類似傾向は認められなかった。ウシ由来 EHEC の薬剤耐性状況は JVARM の調査結果と同様の傾向を示していたため、今後のウシ等の家畜由来細菌の薬剤耐性の動向については JVARM 等の報告データを注視していきたい。ヒト由来 EHEC の薬剤耐性状況については、今後も調査を継続し FOM やその他医療上脅威となる薬剤の耐性菌の動向について監視していく予定である。

文献

- 1) 一般社団法人日本感染症学会, 公益社団法人日本化学療法学会, JAID/JSC 感染症治療ガイド・ガイドライン作成委員会 腸管感染症ワーキンググループ: JAID/JSC 感染症治療ガイドライン 2015—腸管感染症一, 日化療会誌日本化学療法学会雑誌, 64, 31~65, 2016
- 2) 腸管出血性大腸菌感染症の診断治療に関する研究班: 一次, 二次医療機関のための腸管出血性大腸菌 (O157 等) 感染症治療の手引き (改訂版), 1997
- 3) 近真理奈, 他: 下痢症患者から分離された cefotaxime 耐性志賀毒素産生性大腸菌 O26:H11 について, 感染症学雑誌, 79, 161~168, 2005
- 4) 倉園貴至, 他: 埼玉県の腸管系病原菌検出状況 (2012), 埼玉県衛生研究所報, 47, 71~72, 2013
- 5) 国際的に脅威となる感染症対策関係閣僚会議: 薬剤耐性 (AMR) 対策アクションプラン (2016-2020), 2016
- 6) 岩佐奈津美, 他: 福岡市においてヒトから分離された腸管出血性大腸菌の薬剤耐性状況 (2006~2016 年), 日本食品微生物学雑誌, 35, 154~158, 2018
- 7) 日本臨床検査標準協議会: 抗菌薬感受性検査のための標準検査法—第 25 版 (M100-S25)
- 8) 国立感染症研究所: 病原微生物検出情報, 38, 87~88, 2017
- 9) 国立感染症研究所: 病原微生物検出情報, 39, 71~72, 2018
- 10) 吉田紀美, 他: 家畜及び食肉等における腸管出血性大腸菌の血清型別分布状況に関する調査研究, 平成 18 年度愛媛県衛環研年報, 9, 6~9, 2006
- 11) 和田星子, 他: ウシから分離された腸管出血性大腸菌の薬剤感受性試験, 平成 26 年度新潟県食品・環境衛生監視員合同研修会抄録, 2015
- 12) 岩崎直昭 (堺市衛生研究所): 市販食肉類の腸管出血性大腸菌及び食中毒起因菌の汚染実態調査, 公益財団法人 大同生命厚生事業団 地域保健福祉研究助成, 平成 25 年度, 31, 151~155, 2014

- 13) 薬剤耐性ワンヘルス動向調査検討会：薬剤耐性ワンヘルス動向調査年次報告書 2018, 2018
- 14) 溶血性尿毒症症候群の診断・治療ガイドライン作成班：溶血性尿毒症症候群の診断・治療ガイドライン, 7～10, 東京医学社（東京）, 2014
- 15) 北村恵美子, 他：2007～2015年に石川県で分離された腸管出血性大腸菌について—O26, O111の発生状況及び細菌学的性状—, 石川保環研報, 53, 25～29, 2016