

第26回麻布環境科学研究会 一般講演2

国産および輸入鶏肉におけるバンコマイシン耐性腸球菌 (VRE) の分離状況および分離菌株の分子疫学的解析

石崎 直人

東京都健康安全研究センター 微生物部

【目的】バンコマイシン (VCM) 耐性腸球菌 (VRE: Vancomycin Resistant Enterococci) の出現には家畜、特に鶏の成長促進を目的に飼料添加物として使用されていたアボパルシン (AVO) が関与していたことが報告され、ヨーロッパではVREが鶏の糞便や鶏肉などから高頻度に分離されていることも確認されている。AVOとVCMは化学構造が類似しているため、鶏腸管内で長期間AVOに暴露されるとVREが選択的に増加したり、腸球菌がVCM耐性を獲得する事が考えられる。VREの食品への汚染は食品衛生上特に憂慮すべき問題ではないが、VREが環境中に常在した場合重篤な基礎疾患を有する易感染者にとっては問題となる。

わが国では、鶏肉の年間国内消費量の約3割は輸入鶏肉が占めている。主要輸出国はAVOの使用歴のある発展途上国であり、これらの国の鶏肉がVREに汚染されている場合、汚染鶏肉が国内に流通する可能性は大きいものとする。

このような背景から、我々は鶏肉のVRE汚染実態を把握するために、国産および輸入鶏肉を対象に調査を行った。分離菌株については、染色体DNAのRAPD法およびPFGE法により分子疫学的解析を行った。

【材料および方法】平成11年から16年まで東京都内で購入した国産鶏肉248件および輸入鶏肉306件(ブラジル産111件、中国産32件、米国産35件、タイ産32件、フランス産42件、インドネシア産1件、マレーシア産2件)の計554件を対象とした。

鶏肉25gにBuffered Peptone Waterを225ml加え、

37℃、24時間増菌培養した。増菌培養液をVCM6 μg/ml加Enterococcosel Agar (ECSA)に塗抹し37℃、24～48時間分離培養した。ECSA上に発育したエスクリン分解集落を血液寒天で純培養し、van遺伝子検出用プライマーvanA (732 bp) およびvanB (536 bp) を用いてPCR法を実施した。PCR法陽性の菌株についてグラム染色、カタラーゼ試験、6.5%食塩発育試験、Pyrrolidonyl Arylamidase (PYR) 試験を実施しその結果から腸球菌とした。菌種の同定は糖分解能試験およびPCR法を用いて判定した。VCMおよびテイコプラニン (TEIC) に対する薬剤感受性試験はEtestを用いた。分離されたVREについて2つの分子疫学的手法を用いて解析を行った。

①RAPD法：染色体DNAはシリカ法を用いて調整し、AP40, AP41, OPA8, OPA9の計4種類のプライマーを用いてPCR反応を行った。反応液は、4 mM MgCl₂, 200 mM dNTP Mixture, 0.65 U Tag DNA polymerase, 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8.3) および滅菌蒸留水を混合し9 μlに調整し鋳型DNAを1 ml加え、94℃で30秒間、35℃で1分間、72℃で2分間反応させ44回繰り返した。

②PFGE法：菌体をアガロースで包埋後染色体DNAを調整し、制限酵素にはSmaIを用い25℃、6時間消化した。電気泳動はCHEF-Mapperを用いてパルスタイム0.98～17.33 S, 泳動時間23 hで電圧200 Vの泳動条件で行った。

【結果および考察】VREの分離件数：ECSAに発育した疑わしい集落についてPCR法を実施した結果、輸入鶏肉ではvanA遺伝子保有株がブラジル産の1検

体、タイ産の8検体、フランス産の2検体、インドネシア産の1検体、マレーシア産の1検体から分離された。これらの菌株は同定試験の結果、ブラジル株は *Enterococcus faecium*、タイ産2株とマレーシア株は *E. durans* その他の9株は全てが *E. faecalis* と同定された。Etestを用いたMIC値は1株を除き12菌株ともVCMは $>128 \mu\text{g/ml}$ 、TEICは感受性であり、ともに耐性を示す通常のvanA型VREとは異なる耐性傾向であった。中国産鶏肉、米国産鶏肉および国内産鶏肉からはVREは検出されなかった。

分子疫学的解析

RAPD法：*E. durans*3株はAP40, 41では同一のパターンを示したが、OPA8, 9では異なるパターンであった。ブラジル産 *E. faecium* 株はいずれのプライマーを用いても同じパターンを示す株は認められなかった。*E. faecalis* ではAP40, 41で3パターンがそれぞれ2株ずつ、OPA8では2パターンが2株ずつ認

められ、その他の株は異なるパターンであった。OPA9では全ての株が異なるパターンを示した。

PFGE法：制限酵素 *smaI* を用いて消化した結果、同時期に分離されたタイ産鶏肉由来994株と9912株が1バンドを除きほぼ同一のPFGEパターンを示し、その他の株は多岐に渡るパターンであった。PFGEで同一のパターンを示したタイ産鶏肉由来2株はRAPD法においても使用するプライマーによっては同一のパターンを示していた。

今回の調査で、VREに汚染された輸入鶏肉が日本に持続的に流入していることが確認できた。厚生労働省の調査では、平成13年度にドイツ産豚肉からVREを検出していることから鶏肉以外の食肉についても調査をする必要があると思われる。国産鶏肉からはVREを検出しなかったが引き続き継続して実態調査を行なうとともに検査体制の充実をはからなければならない。