

宮城県内の大規模食鳥処理場における基質特異性拡張型

 β -ラクタマーゼ産生大腸菌の分離状況菊地利紀^{1)†} 菅原ゆかり¹⁾ 植木 洋²⁾ 後藤郁男¹⁾

1) 宮城県食肉衛生検査所 (〒987-0311 登米市米山町字桜岡今泉 314)

2) 宮城県保健環境センター (〒983-0836 仙台市宮城野区幸町 4-7-2)

(2018年1月23日受付・2018年6月13日受理)

要 約

宮城県内の大規模食鳥処理場における基質特異性拡張型 β -ラクタマーゼ (ESBL) 産生大腸菌の浸潤状況を調査し、処理工程における交差汚染の有無について検討した。ブロイラーと体120検体中78検体 (65%) からESBL産生大腸菌が分離された。検出されたESBL遺伝子は $bla_{CTX-M-1\ group}$ 及び $bla_{CTX-M-2\ group}$ であり、CTX-M型が主であった。また、O抗原血清型はO18, O111, O153, O157及び血清型不明であった。これらの結果はロットによって異なったため、分離されたESBL産生大腸菌は各農場に由来し、生体搬入から内臓摘出までの処理工程で交差汚染は認められなかった。宮城県内の養鶏にはESBL産生大腸菌が高率に浸潤しており、農場ごとの耐性菌対策や処理場での汚染拡大防止が重要である。——キーワード：ブロイラー, ESBL, 大腸菌, 宮城県, 食鳥処理場。

-----日獣会誌 71, 655~659 (2018)

β -ラクタマーゼは、グラム陰性菌が産生するペニシリンなどの β -ラクタム薬を分解する酵素である。その中でも基質特異性拡張型 β -ラクタマーゼ (ESBL) は、Bushら [1, 2] の分類で2bに属する β -ラクタマーゼが、アミノ酸配列の変異などにより第3世代セファロスポリン系薬剤の分解能を獲得した酵素である。ESBLをコードする遺伝子は、おもにプラスミド上にあり、このプラスミドが他菌種に伝播して、薬剤耐性を獲得するため、各種病原細菌への拡大が危惧されている [3, 4]。

現在、人の医療現場において薬剤耐性菌の増加が大きな問題となっており、ESBL産生菌は日本においても2000年以降急速に増加している [3]。家畜における調査では、特にブロイラーからのESBL産生大腸菌の検出報告が多く [5, 6]、人の医療現場におけるESBL産生菌との関連性が指摘されているが [6-8]、その実態は明らかとなっていない。食鳥処理工程における食鳥肉の汚染を問題視する報告もみられるが [6, 9]、宮城県内の食鳥処理場におけるESBL産生大腸菌の検出状況は不明であった。そこで、本研究では宮城県内の食鳥処理場におけるESBL産生大腸菌の実態を明らかにし、

処理工程における交差汚染の有無を検討するため、宮城県内の大規模食鳥処理場に搬入されたブロイラーよりESBL産生大腸菌を分離し、その性状と保有するESBL遺伝子の解析を行ったので報告する。

材料及び方法

材料：平成27年7~10月に宮城県内の大規模食鳥処理場に搬入され、脱羽後検査及び内臓摘出後検査において全部廃棄処分となったブロイラーを対象とし、滅菌剪刀を用いて浅胸筋とその近位の皮膚を採取した。ブロイラーは8農場 (A~H) 12鶏舎に由来し、採取検体数を各10検体 (計120検体) とした。また、処理工程における交差汚染の可能性を評価するため、検体採取については、食鳥処理が連続する3ロット (1ロット1鶏舎) を対象とし、計12ロット実施した。

セフトキシム (CTX) 耐性大腸菌の分離：検体にEC培地 (栄研化学株, 栃木) 50mlを加え、ストマッカーで粉碎後、37℃で18~24時間増菌培養した。増菌液を4mg/l CTX加マッコンキー寒天培地に塗布し、37℃で18~24時間培養した。発育した菌はグラム染色により

† 連絡責任者：菊地利紀 (宮城県食肉衛生検査所)

〒987-0311 登米市米山町字桜岡今泉 314

☎ 0220-55-3752 FAX 0220-55-4105

E-mail : kikuchi-to911@pref.miyagi.lg.jp

形態を確認後、TSI 培地 (Becton, Dickinson and Company, U.S.A.) 及び LIM 培地 (栄研化学株, 栃木) に接種し、生化学性状検査により大腸菌と同定した。さらに、大腸菌と判定した菌株については、病原大腸菌免疫血清 (デンカ生研株, 東京) を用いた O 抗原血清型別試験を実施した。また、ベロ毒素 (VT) 産生が疑われる血清型については、細菌毒素検出キット (VTEC-RPLA「生研」, デンカ生研株, 東京) を用いて VT 産生能を確認した。

ESBL 遺伝子の検出: ESBL をコードする遺伝子として *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{CTX-M-1 group}, *bla*_{CTX-M-2 group}, *bla*_{CTX-M-8 group} 及び *bla*_{CTX-M-9 group} を Shibata ら [10] のプライマーを用いたコンベンショナル PCR 法 (cPCR) により検索した。テンプレートは、滅菌精製水 100 μ l に分離した菌を懸濁し、95 $^{\circ}$ C で 6 分間加熱後、12,000rpm で 2 分間遠心分離し、その上清とした。cPCR は、キット (TaKaRa Ex Taq, タカラバイオ株, 滋賀) を用い、94 $^{\circ}$ C 1 分の熱変性後、94 $^{\circ}$ C 1 分、55 $^{\circ}$ C 1 分、72 $^{\circ}$ C 1 分の反応サイクルを 35 回繰り返す。最後に 72 $^{\circ}$ C 3 分の伸長反応を行った。cPCR 産物は電気泳動を行い、特異バンドの有無を確認した。

塩基配列の決定: *bla*_{TEM} が検出された菌株については、ダイレクトシークエンス法により塩基配列を決定し、遺伝子にコードされている酵素型を明らかにした。そのためにも、核酸精製用マイクロスピナラム (MicroSpin S-300 HR Columns, GE Healthcare UK Ltd, U.K.) を用いて cPCR 産物から DNA を精製した。次に、シークエンス反作用蛍光色素 (BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit, Life technologies, U.S.A.) を用いたサイクルシークエンス反応を行い、未反応ダイターミネーター除去用スピナラム (AutoSeq G-50, GE Healthcare UK Ltd, U.K.) を用いて余剰のダイターミネーターを除去し、DNA シークエンサー (ABI PRISM 3130xl Genetic Analyzer, Thermo Fisher Scientific, U.S.A.) で解析した。

薬剤感受性試験: 分離された一部の菌株については、アメリカ臨床検査標準委員会 (CLSI) が定めるディスク拡散法により、CTX 及びセフトジジム (CAZ) の単剤ディスク (Becton, Dickinson and Company, U.S.A.) 及びクラブラン酸 (CAV) 加ディスク (栄研化学株, 栃木) を用いて ESBL 産生能の確認試験を実施した。判定については、単剤ディスクと CAV 加ディスクの阻止円の直径の差が 5mm 以上あった場合に ESBL 産生能有とした。また、セファロスポリン系薬剤に対する薬剤感受性を確認するため、CTX 及び CAZ に加え、セフドキシム (CPDX) 及びセフピロム (CPR) についても同様に試験を実施した。

表 1 ESBL 産生大腸菌検出率及び分離菌株数

農場	ESBL 産生大腸菌検出率 (%)	分離菌株数
A-1	70	9
B	60	6
A-2	60	6
C	90	9
D	30	3
E	100	13
A-3	80	9
F	80	10
A-4	100	11
G-1	10	1
G-2	0	0
H	100	11
計	65 (78/120 検体)	88

成 績

CTX 耐性大腸菌の検出状況: CTX 耐性大腸菌は 120 検体中 79 検体 (65.8%) から検出され、88 株を分離した。農場別では、A 農場の第 4 鶏舎、E 農場、H 農場で検出率 100% (10/10 検体) と高値を示した。対照的に G 農場の 2 鶏舎では、それぞれ検出率 10% (1/10 検体) 及び 0% (0/10 検体)、D 農場では 30% (3/10 検体) と低値を示した (表 1)。その他の農場及び鶏舎では、検出率は 60~90% であった。

ESBL 遺伝子の検出状況: cPCR により、*bla*_{TEM}, *bla*_{CTX-M-1 group} 及び *bla*_{CTX-M-2 group} の 3 遺伝子が検出された (表 2)。*bla*_{CTX-M-2 group} が全体の 86% (76/88 株) を占め、そのうち 32% (25/76 株) は *bla*_{TEM} も保有していた。*bla*_{TEM} を単独で保有していたのは 88 株中 1 株のみであった。*bla*_{CTX-M-1 group} を保有する株は 12% (11/88 株) であった。農場別では、C 農場において 3 遺伝子すべてが検出されたが、その他の農場では *bla*_{TEM} 及び *bla*_{CTX-M-2 group}, または *bla*_{CTX-M-1 group} のいずれかが検出された。検出された *bla*_{TEM} の DNA シークエンス解析を実施したところ、*bla*_{TEM} を単独で保有する 1 株が *bla*_{TEM-135}, その他の株についてはすべて *bla*_{TEM-1} であることが判明した。TEM-1 及び TEM-135 は ESBL ではないため、ESBL 産生大腸菌の検出率は CTX 耐性大腸菌のうち *bla*_{TEM-135} 単独保有株を除く 65% (120 検体中 78 検体) であった。

O 抗原血清型: 型別が可能であった大腸菌の血清型は、O18, O111, O153, O157 であり、農場によって主となる血清型が異なる傾向が認められた。一方、62% (55/88 株) が血清型不明 (OUT) であった (表 3)。また、分離された O111 及び O157 に VT 産生能は認められなかった。

薬剤感受性試験: 分離培養で薬剤耐性大腸菌と判定さ

表2 分離された大腸菌のβ-ラクタマーゼ遺伝子別菌株数

農場	β-ラクタマーゼ遺伝子			
	<i>bla</i> _{TEM-135}	<i>bla</i> _{CTX-M-1 group}	<i>bla</i> _{CTX-M-2 group}	<i>bla</i> _{TEM-1, bla} _{CTX-M-2 group}
A-1			7	2
B			6	
A-2			4	2
C		7	1	1
D		3		
E				13
A-3	1		1	7
F			10	
A-4			11	
G-1		1		
G-2				
H			11	
計	1	11	51	25

表3 分離された大腸菌のO抗原血清型別菌株数

農場	O抗原血清型				
	O18	O111	O153	O157	OUT
A-1	3			6	
B					6
A-2				5	1
C	1	7			1
D		3			
E	6				7
A-3			1	1	7
F					10
A-4					11
G-1					1
G-2					
H					11
計	10	10	1	12	55

れた株は、ディスク拡散法でESBL産生が認められ、第3世代のCTX及び第2世代のCPDXにすべての株が耐性を示した (*bla*_{TEM-135}を保有する株を除く)。一方、第3世代のCAZにはすべての株が感受性を示した。第4世代のCPRには中間耐性から耐性を示す株が多く認められた。

考 察

一般に、薬剤耐性菌の増加は薬剤使用による選択圧が原因とされており [11]、プロイラーにおけるESBL産生菌の増加は、養鶏場におけるワクチン接種時に大腸菌症の予防などの目的で卵内接種されていたセフトオフル (CTF) に起因することが示されている。そのため、カナダでは2005年の使用自粛に伴い耐性菌の減少が報告されている [12]。日本においても、国内の家畜における薬剤耐性モニタリング (JVARM) によると、CTXなどに対して耐性を示す大腸菌は減少しており、これは2012年3月にCTFの適用外使用が自粛されたことが要因と考えられる [13]。一方、Hiroiら [14] は、抗生物質の使用状況よりも飼育環境の耐性菌による汚染の方が、耐性菌の出現に大きく関与している可能性を指摘している。本研究の調査結果より、宮城県内のプロイラーは、ESBL産生大腸菌を高率に保菌していることが明らかとなった。これを受けて、当該農場の獣医師 (対象農場をすべて担当) に、素糲供給業者やCTFなどのセファロスポリン系薬剤の使用状況について聞き取り調査を実施した。その結果、素糲供給業者は状況に応じて4社に依頼しているが、セファロスポリン系薬剤は素糲供給業者も含めて使用していないとの回答が得られた。このことから、今回、ESBL産生大腸菌が高率に検出された直接の原因は不明であるが、ESBL産生大腸菌の検出率が

農場によって、または鶏舎によって大きく異なっていたことを考慮すると、CTF自粛から現在に至るまでの期間に、農場を含めた環境中にESBL遺伝子が保存されている可能性が考えられた。

ESBLにはさまざまな型が存在し、主要なものではTEM型、SHV型及びCTX-M型があり [1, 2]、日本国内ではCTX-M型が主流である [15]。また、TEM型及びSHV型はCAZを分解しやすいセフトアジマーゼに分類され、CTX-M型はCTXを分解しやすいセフトキシマーゼに分類される [16]。本研究でESBL遺伝子として*bla*_{CTX-M-1 group}及び*bla*_{CTX-M-2 group}の2遺伝子のみが検出されたことは、初期の分離の段階でCTXによる選択圧をかけていたことに起因するものと考えられた。また、TEM-135は182番目のメチオニンがスレオニンに置換されたものである [17] が、Bushら [1, 2] の分類では2bに分類され、ESBLには該当しない。しかし、プロイラーからの*bla*_{TEM-135}の検出報告は認められないことから、検出報告例として決定した塩基配列を遺伝子データベースに登録した (Accession No. LC110194)。

森田ら [9] は、食鳥肉の流通品からESBL産生大腸菌が検出される理由の一つとして、食鳥処理工程における交差汚染を指摘している。本研究では各検体採取において処理が連続した3ロットを対象としたが、分離された大腸菌のESBL遺伝子、O抗原血清型及び薬剤耐性パターンはロット間で明らかに異なっており、生体搬入から内臓摘出処理までの工程における連続した3ロット間では交差汚染は認められなかった。しかしながら、処理工程全般にわたる調査報告はなく、交差汚染の実態解明にはさらなる調査が求められる。

ESBLは第3世代セファロスポリン系薬剤を分解でき

る β -ラクタマーゼである [4] が、本研究では第 4 世代セファロsporin系薬剤である CPR にも耐性を示す株が多く分離され、プロイラー由来の ESBL 産生大腸菌がすでに第 4 世代セファロsporin系薬剤にも耐性を獲得していることが明らかとなった。したがって、人由来株との関連性は明らかでないものの ESBL 遺伝子はプラスミドで容易に伝播するため、今後、人の医療現場においても第 4 世代セファロsporin系薬剤に対する耐性菌が増加する可能性が考えられた。

今回、当該処理場で処理された製品の調査は実施しておらず、分離されたプロイラー由来株と人由来 ESBL 産生菌との関連性は不明である。しかしながら、ESBL 産生菌が関与する食中毒が疑われる事例も報告されている [18] ことから、農場における耐性菌対策及び処理場における汚染拡大の防止は重要である。したがって、今後、内臓摘出以降の処理工程においても調査を実施するとともに、プロイラー由来と人由来 ESBL 産生菌とを比較することにより、両者の関連性を明らかにする必要がある。

引用文献

- [1] Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA : A functional classification scheme for β -lactamases and its correlation with molecular structure, *Antimicrob Agents Ch*, 39, 1211-1233 (1995)
- [2] Bush K, Jacoby GA : Updated functional classification of β -lactamases, *Antimicrob Agents Ch*, 54, 969-976 (2010)
- [3] 小野寺直人, 山田友紀, 櫻井 滋, 鈴木啓二郎, 諏訪部章 : 基質特異性拡張型 β -ラクタマーゼ産生菌の分離状況 —異なる 2 施設の分離状況の特徴とその要因分析—, *日化療会誌*, 60, 553-559 (2012)
- [4] 荒川宜親 : 広域 β -ラクタム薬耐性に関する β -ラクタマーゼの特徴と遺伝的相関, *日臨微生物誌*, 13, 150-161 (2003)
- [5] Kojima A, Ishii Y, Ishihara K, Esaki H, Asai T, Oda C, Tamura Y, Takahashi T, Yamaguchi K : Extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Escherichia coli* strains isolated from farm animals from 1999 to 2002: Report from the Japanese Veterinary Antimicrobial Resistance Monitoring Program, *Antimicrob Agents Ch*, 49, 3533-3537 (2005)
- [6] 木口陽介, 小嶋 暢, 遠藤千春, 齋藤友佳, 楠本正博 : プロイラーから分離された大腸菌の β -ラクタマーゼ産生性及び分子疫学的性状に関する研究, *日獣会誌*, 67, 739-746 (2014)
- [7] Doi Y, Paterson DL, Egea P, Pascual A, López-Cerero L, Navarro MD, Adams-Haduch JM, Qureshi ZA, Sidjabat HE, Rodríguez-Baño J : Extended-spectrum and CMY-type β -lactamase-producing *Escherichia coli* in clinical samples and retail meat from Pittsburgh, USA and Seville, Spain, *Clin Microbiol Infect*, 16, 33-38 (2010)
- [8] 石畝 史, 永田暁洋, 鈴木里和, 山崎史子, 望月典郎, 荒川宜親 : 福井県内における人および鶏肉由来基質特異性拡張型 β -ラクタマーゼ産生大腸菌の分子疫学的解析, *日獣会誌*, 63, 883-887 (2010)
- [9] 森田 幸, 根ヶ山 清, 三好そよ美, 木内洋之, 梶川達志, 未澤千草, 上野一郎, 村尾孝児 : 食用鶏腸管内容物と市販鶏肉における ESBL 産生 *E. coli* の検出状況と汚染経路の検討, *医学検査*, 63, 294-299 (2014)
- [10] Shibata N, Kurokawa H, Doi Y, Yagi T, Yamane K, Wachino J, Suzuki S, Kimura K, Ishikawa S, Kato H, Ozawa Y, Shibayama K, Kai K, Konda T, Arakawa Y : PCR classification of CTX-M-type β -lactamase genes identified in clinically isolated gram-negative bacilli in Japan, *Antimicrob Agents Ch*, 50, 791-795 (2006)
- [11] 品川長夫 : 病院感染と抗菌薬, *日化療会誌*, 53, 507-511 (2005)
- [12] Dutil L, Irwin R, Finley R, Ng LK, Avery B, Boerlin P, Bourgault AM, Cole L, Daignault D, Desruisseau A, Demczuk W, Hoang L, Horsman GB, Ismail J, Jamieson F, Maki A, Pacagnella A, Pillai DR : Ceftiofur resistance in salmonella enterica serovar Heidelberg from chicken meat and humans, Canada, *Emerg Infect Dis*, 16, 48-54 (2010)
- [13] Hiki M, Usui M, Kojima A, Ozawa M, Ishii Y, Asai T : Diversity of plasmid replicons encoding the blaCMY-2 gene in broad-spectrum cephalosporin-resistant *Escherichia coli* from livestock animals in Japan, *Foodborne Pathog Dis*, 10, 243-249 (2013)
- [14] Hiroi M, Matsui S, Kubo R, Iida N, Noda Y, Kanda T, Sugiyama K, Hara-Kudo Y, Ohashi N : Factors for occurrence of extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* in broilers, *J Vet Med Sci*, 74, 1635-1637 (2012)
- [15] 原田和記, 浅井鉄夫 : 動物に由来する CTX-M 型基質拡張型 β -ラクタマーゼ産生大腸菌, *日化療会誌*, 63, 181-186 (2015)
- [16] Bonnet R : Growing group of extended-spectrum β -lactamases: the CTX-M enzymes, *Antimicrob Agents Ch*, 48, 1-14 (2004)
- [17] Gianecini R, Oviedo C, Littvik A, Mendez E, Piccoli L, Montibello S, Galarza P : Identification of TEM-135 β -lactamase in *Neisseria gonorrhoeae* strains carrying African and Toronto plasmids in Argentina, *Antimicrob Agents Ch*, 59, 717-720 (2015)
- [18] 上野正浩 : 基質特異性拡張型ベータラクタマーゼ産生 *Salmonella* Heidelberg の国内初報告例, *小児感染免疫*, 25, 23-27 (2013)

Isolation of Extended Spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli*
at Poultry Processing Plant in Miyagi, Japan

Toshinori KIKUCHI^{1)†}, Yukari SUGAWARA¹⁾, Yo UEKI²⁾ and Ikuo GOTO¹⁾

1) *Miyagi Prefectural Meat Hygiene Inspection Office, 314 Imaizumi, Sakuraoka, Yoneyama-cho, Tome, 987-0311, Japan*

2) *Miyagi Prefectural Institute of Public Health and Environment, 4-7-2 Saiwai-cho, Miyagino-ku, Sendai, 983-0836, Japan*

SUMMARY

In this study, we investigated the extent of contamination with extended-spectrum β -lactamase (ESBL)-producing *Escherichia coli* and cross contamination at a large-scale poultry processing plant that annually slaughters over 300,000 broilers in Miyagi. ESBL-producing *E. coli* strains were isolated from 65% of broiler samples (78/120), which were collected from the superficial pectoralis, including the proximal skin following evisceration. The major ESBL type identified was CTX-M, based on the detection of the *bla*_{CTX-M-1} group and the *bla*_{CTX-M-2} group ESBL genes. Although O serotypes O18, O111, O153, and O157 were identified, many of the *E. coli* strains were of unknown serotype. These results differed among farms, indicating that the ESBL-producing *E. coli* isolates were farm-specific, with a low possibility of cross contamination prior to evisceration at the poultry processing plant. The contamination of poultry meat by ESBL-producing *E. coli* in Miyagi was quite high, indicating the need to implement not only effective but preventive strategies for contamination with antibiotic-resistant bacteria at each farm and poultry processing plant.

— Key words : broiler, ESBL, *E. coli*, Miyagi, poultry processing plant.

† Correspondence to : Toshinori KIKUCHI (Miyagi Prefectural Meat Hygiene Inspection Office)

314 Imaizumi, Sakuraoka, Yoneyama-cho, Tome, 987-0311, Japan

TEL 0220-55-3752 FAX 0220-55-4105 E-mail : kikuchi-to911@pref.miyagi.lg.jp

— J. Jpn. Vet. Med. Assoc., 71, 655 ~ 659 (2018)