

## 島根県における食肉の基質特異性拡張型βラクタマーゼ (ESBL) 産生大腸菌の汚染状況及び食肉由来株とヒト由来株との比較

黒崎守人・岸 亮子・川瀬 遵・熱田純子・高橋起男・福島 博

キーワード：基質特異性拡張型βラクタマーゼ、ESBL、大腸菌、  
CTX-M-1、CTX-M-2、CTX-M-9、TEM、SHV

### Extended-Spectrum β-Lactamase Producing *Escherichia coli* Strains from Meats and Clinical Isolates in Shimane Prefecture

Morito KUROSAKI, Ryouko KISHI, Jun KAWASE, Junko ATSUTA,  
Tatsuo TAKAHASHI and Hiroshi FUKUSHIMA

Key word : extended-spectrum β-lactamase, ESBL, *Escherichia coli*,  
CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-9, TEM, SHV

#### 1. はじめに

近年、薬剤耐性菌の一つである基質特異性拡張型βラクタマーゼ (Extended spectrum β-lactamases : ESBL) 産生菌は院内感染の原因として重要視されている<sup>1)</sup>。

島根県内の医療機関における同菌の浸淫状況について調査したところ、7医療機関から提供を受けた大腸菌の10%にESBL産生性があり、遺伝子型ではCTX-M-9グループ (以下G) が大半を占める (81.4%) がCTX-M-1G、CTX-M-2G、TEM型の遺伝子を保有するものも検出されており、様々な遺伝子型のESBL産生大腸菌が浸淫していることが示唆された<sup>2)</sup>。また、通院や入院後間もない患者からも検出されることから、市中において感染している可能性も考えられた<sup>2)</sup>。

一方、舟木ほか<sup>3)</sup>は県内で飼育されていた牛からCTX-M-2GのESBL産生菌を分離しており、また、松下ほか<sup>4)</sup>はESBL産生大腸菌は国内の市販の鶏肉から高頻度に検出されることから、本菌が広く市中に拡散しており市中から院内へ持ち込まれている可能性を指摘している。

そこで、島根県におけるESBL産生大腸菌の実態を把握するため、同菌の食肉の汚染状況を調査するとともに、食肉から分離された株とヒト由来株についてESBL産生遺伝子型の比較を行ったので報告する。

#### 2. 材料と方法

##### 2.1 検体およびスクリーニング試験

食肉の汚染状況を調査するために、2008年5月から2009年2月まで2週間に1回程度、島根県東部の2食肉処理施設に入荷された牛肉 (16検体)、豚肉 (16検体)、鶏肉 (118検体) の包装内浸出液 (以下ドリップ) を滅菌綿棒で採取し検体とした。また、これらの家畜の産地についても調査した。

検体は綿棒ごとBPW (Buffered Peptone Water) で前増菌 (37°C 1夜) し、その1mLを10mLの2ppm CTX加MacCONKEY BROTHに接種し選択増菌 (37°C 1夜) 培養後、塩酸処理 (0.5%NaClで調製した1/8N HClで30秒) し、2ppm CTX加Chromocult Coliform Agarで選択分離培養 (37°C 1夜) した。培地上に発育したコロニーが密集し分離していない部分を掻き取り滅菌蒸留水200μLに浮遊させ、100°C、10分加熱後、10,000rpm、1分間遠心分離し、その上清をPCR検査のテンプレートとしスクリーニング試験に供した。

スクリーニング試験は表1のTEM、SHV、CTX-M型の遺伝子を検出するプライマー<sup>5)</sup>を用いて、初期変性95°C15分1サイクル後、熱変性95°C30秒、アニーリング60°C30秒、伸長72°C2分15秒を30サイクル、最終伸長72°C10分1サイクルでmultiplex PCR法により実施した。増幅産物の確認は2%アガロースゲル、0.5×TBEバッファーで電気泳動しエチジウムブロマイド染色により行った。

## 2.2 ESBL産生大腸菌の

### 分離同定および遺伝子型別

スクリーニング試験で陽性となった平板から1検体当たり約20コロニー鈎菌し、スクリーニング試験と同様にmultiplex PCR法により遺伝子型別を行った。CTX-M型の遺伝子を保有する株についてはさらに表2のCTX-M-1、CTX-M-2、CTX-M-8、CTX-M-9Gの遺伝子を検出するプライマー<sup>6)</sup>を用いて、初期変性95°C 2分1サイクル後、熱変性95°C 1分、アニーリング55°C 1分、伸長72°C 1分を30サイクル、最終伸長72°C 10分1サイクルでCTX-M-G型別をmultiplex PCR法により行った。

またそれと平行して生化学的性状を確認した結果*E.coli*と同定された株のうち、同一の検体からの同じ性状で同じ遺伝子型のものは1株としてESBLs確認用ディスク(栄研化学)を用いてESBL産生性の確認を行った。

## 2.3 ヒト由来株

ヒト由来株については2008年5月から2009年3月まで島根県東部の2医療機関からESBL産生菌と判定された株の提供を受け、当所で*E.coli*と同定した60株について、食肉由来株と同様にESBL産生遺伝子型別、CTX-M-G型別を行った。

## 3. 結果

### 3.1 ESBL産生大腸菌の食肉の汚染状況(表3)

スクリーニング検査で牛肉ドリップ16検体、豚肉ドリップ16検体からはTEM型、SHV型、CTX-M型の遺伝子は検出されず、鶏肉ドリップ118検体中75検体(63.6%)からいずれかの型の遺伝子が単独あるいは複数検出された。

75検体中54検体から64株の*E.coli*が分離され、ESBL確認試験により54株(45検体)がESBL産生性と確定された。2つの食肉処理施設間でスクリーニング試験による遺伝子の検出率、ESBL産生大腸菌の分離率には明らかな差は認められなかった。(表3)

表3. 鶏肉ドリップからの食肉処理施設別ESBL産生大腸菌分離状況(検体数)

食肉処理施設	検体数	スクリーニング試験		ESBL遺伝子保有 <i>E.coli</i>		ESBLs確認試験	
		陰性	陽性	分離不可	分離	陰性	陽性
A	59	21	38	7	31	9	22
B	59	22	37	14	23	0	23

表1. ESBL産生遺伝子検出用プライマー

ESBL遺伝子型	プライマー名	PCR産物サイズ	塩基配列(5'-3')
<sup>bla</sup> SHV	bla-SHV.SE	747bp	atg cgt tat att cgc ctg tg
	bla-SHV.AS		tgc ttt gtt att cgg gcc aa
<sup>bla</sup> TEM	TEM-164.SE	445bp	tgc cgg cat aca cta ttc tca gaa tga
	TEM-165.AS		acg ctc acc ggc tcc aga ttt at
<sup>bla</sup> CTX-M	CTX-M-U1	593bp	atg tgc agy acc agt aar gtk atg gc
	CTX-M-U2		tgg gtr aar tar gts acc aga ayc agc gg

表2. CTX-Mグループ型別用プライマー

CTX-Mグループ	プライマー名	PCR産物サイズ	塩基配列(5'-3')
CTX-M-1グループ	CTXM7	260bp	gcg tga tac cac ttc acc tc
	CTXM8		tga agt aag tga cca gaa tc
CTX-M-2グループ	CTXM17	341bp	tga tac cac cac gcc gct c
	CTXM18		tat tgc atc aga aac cgt ggg
CTX-M-8グループ	CTXM19	207bp	caa tct gac gtt ggg caa tg
	CTXM20		ata acc gtc ggt gac aat t
CTX-M-9グループ	CTXM11	293bp	atc aag cct gcc cga tct ggt ta
	CTXM12		gta agc tga cgc aac gtc tgc

## 3.2 鶏肉由来のESBL産生大腸菌の遺伝子型(表4)

54株中TEM型の遺伝子を保有するものが31株(57.4%:単独保有10株、+SHV型13株、+CTX-M型8株)と最も多く、次いでCTX-M型のものが25株(46.3%:単独保有17株)、SHV型のものが19株(35.2%:単独保有6株)であった。

CTX-M型の25株についてさらにグループ型別を行ったところ、CTX-M-2Gの遺伝子を保有するものが12株(48.0%:単独保有10株)、CTX-M-9Gは9株(36.0%:単独保有5株)、CTX-M-1Gは3株(12.0%:単独保有1株)、型別不能が1株であった。

ESBL産生大腸菌の遺伝子型を両施設間で比較すると、CTX-M-2Gの遺伝子が検出された12株中10株がA食肉処理場の鶏肉ドリップ由来であり、CTX-M-9Gの遺伝子が検出された9株は全てB食肉処理場の鶏肉ドリップから検出された。また、A食肉処理場の鶏肉検体はほとんどが島根県産であり、B食肉処理場のそれは全て岡山県産であった。

表4. 鶏肉におけるESBL産生大腸菌の遺伝子型

食肉処理施設	総数	CTX-M-1G			CTX-M-2G			CTX-M-9G			SHV			TEM	UT
		小計	単独	+TEM	小計	単独	+TEM	小計	単独	+TEM	小計	単独	+TEM		
A	27	2	1	1	10	8	2				10	1	9	5	
B	27	1		1	2	2		9	5	4	9	5	4	5	1
計	54	3	1	2	12	10	2	9	5	4	19	6	13	10	1

### 3.3 ヒト由来ESBL産生大腸菌の遺伝子型

60株中CTX-M-9Gの遺伝子を保有するものが51株(85.0%:単独保有48株、+TEM型3株)と最も多く、CTX-M-1Gが4株(単独保有1株、+TEM型3株)、CTX-M-2Gが3株(単独保有2株、+TEM型1株)、TEM型が9株(うち単独保有は2株)であった。SHV型の遺伝子は検出されなかった(表5)。

## 4. 考 察

今回の調査でESBL産生大腸菌は牛肉ドリップ、豚肉ドリップからは検出されず、鶏肉ドリップからのみ高率に検出された。舟木ほか<sup>3)</sup>は島根県内で飼育されていた牛の糞便からCTX-M-2GのESBL産生大腸菌を検出しており、と畜場と食鳥処理場の衛生状態の差により鶏肉のみからの検出につながったとも考えられる。Kojima et al<sup>7)</sup>は1999年から2002年にわが国の肥育牛、肥育豚、産卵鶏、肉用鶏の糞便から収集された大腸菌2,747株のうち、肉用鶏からのみ6株のCTX-M型のESBL産生株を分離しており、また松下ほか<sup>4)</sup>各種の市販食品から分離された大腸菌637株のうちESBL産生性の18株は全て鶏肉由来であったと報告していることから、鶏が主要なESBL産生大腸菌の保菌動物であり市販の鶏肉が高率に汚染を受けていることは今回の調査からも明らかである。

ヒト由来株の遺伝子型は他の報告<sup>9)</sup>と同様CTX-M-9Gが多くを占めた。島根県においてもCTX-M-9Gの遺伝子型のESBL産生大腸菌が主流であるが、CTX-M-1G、CTX-M-2G、TEM型も検出されており、遺伝子型の経年的な変化を把握するために今後も継続して監視することが必要と考えられる。

一方、鶏肉ドリップから分離されたESBL産生大腸菌の遺伝子型はTEM型が最も多く次いでCTX-M型であり、ヒトからは検出されなかったSHV型も検出され、ヒトにおけるESBL産生大腸菌の遺伝子型の分布とは異なっていた。

2つの食肉処理場間で比較すると、CTX-M-2Gの遺伝子が検出された検体の多くはA処理場の島根県産

表5. ヒト由来ESBL産生大腸菌の遺伝子型

医療機関	総数	CTX-M-1G			CTX-M-2G			CTX-M-9G			TEM
		小計	単独	+TEM	小計	単独	+TEM	小計	単独	+TEM	
C	46	0	0	0	2	2	0	43	40	3	1
D	14	4	1	3	1	0	1	8	8	0	1

の鶏由来であり、CTX-M-9Gのそれは全てがB処理場の岡山県産の鶏由来であった。ESBL産生大腸菌の遺伝子型の分布は地域あるいは農場により異なることが示唆された。

今回、ESBL産生大腸菌の遺伝子型のヒトにおける分布と鶏における分布について関連があるという結果は得られなかったが、鶏由来の検体からは高率にESBL産生大腸菌が分離されており、鶏肉が市中においてESBL産生大腸菌のヒトへの感染源となりうる可能性を否定できない。ヒト由来株と鶏肉由来株の関連性についてより詳細に検討する必要がある。

島根県内のESBL産生大腸菌は、検出頻度、遺伝子型の多様化とも増加傾向にあると推測される。また、赤痢菌や腸管出血性大腸菌といった病原性の強い菌からもESBL産生遺伝子の検出が報告されており<sup>9) 10)</sup>、今後もその動向に監視が必要だと思われる。

## 文 献

- 1) 島山薫ほか: Ann.Rep.Tokyo Metr.Inst.P.H., 57, 69 (2006)
- 2) 岸亮子ほか: 島根県保健環境科学研究所報, 50, 66 (2008)
- 3) 舟木博史ほか: 島根県家畜病性鑑定室報, 12, 13 (2008)
- 4) 松下秀ほか: モダンメディア, 54, 202 (2008)
- 5) H.-J.MONSTEIN et al.: APMIS 115:1400-8(2007)
- 6) Li Xu et al.: J.Medical Microbiology (2005), 54, 1183-1187
- 7) Kojima, A.et al.: Antimicrob.Agents Chemother., 49, 3533 (2005)
- 8) 石畝史ほか: 感染症学雑誌, 82, 317 (2008)
- 9) 近真理奈ほか: 感染症学雑誌, 79, 161 (2005)
- 10) IASR, 28, 45-46 (2007)