

長崎県内のと畜場搬入家畜における
基質特異性拡張型β-ラクタマーゼ(ESBL)産生大腸菌の疫学調査

長崎県諫早食肉衛生検査所国見支所 ○橋本 由絹、右田 雄二¹⁾、
高木 由美香¹⁾、山崎 省吾
¹⁾長崎県環境保健研究センター

はじめに

基質特異性拡張型β-ラクタマーゼ(ESBL)は、ペニシリン系、第一・第二世代セフェム系抗生物質に加え、畜産領域および人の医療において重要視される第三・第四世代セフェム系抗生物質にも耐性を獲得した酵素である。近年、これを産生するESBL産生大腸菌の医療機関における検出感度が高まっている〔1〕。また、牛、豚、鶏食肉から分離されることも多く、重要な保菌動物である可能性が指摘されている〔2〕。本菌は、長崎県内で調査されておらず、本調査において長崎県内と畜場搬入家畜の豚および牛におけるESBL産生大腸菌の保菌状況および疫学的特徴を調査し、その分離傾向について他県と比較した。

材料及び方法

材料：令和元年10月から12月に搬入された豚23農場107頭の直腸便、牛48農場63頭の盲腸便の計170検体とした。

ESBL産生大腸菌の分離：糞便を4 mg/l CTX 添加マッコンキー寒天培地に直接塗抹し、35°C、24時間培養した。赤色コロニーを分離し、TSI、LIM、SC、CLIG培地を用いて生化学性状を確認した。大腸菌と推定された菌株について、Clinical Laboratory Standards Institute(CLSI)に記載されているESBL産生菌の検出方法(ディスク拡散法)に従い、スクリーニングおよび確認テストを実施し、アピ20E(BIOMERIEUX)を用いて大腸菌であることを確認した。

ESBL遺伝子型別試験：ESBL遺伝子の型別はTEM型、SHV型、CTX-M-1、2、9groupのプライマーを用いて、PCR法により実施した〔3、4〕。また、CTX-M groupに分類された菌株について、ESBL遺伝子のシーケンス解析により、遺伝子型別を行った。

○群血清型別試験：病原大腸菌免疫血清「生研」○群血清(デンカ生研)を用いて、凝集の有無を確認し判定した。○群型別不能であった菌株は、OUTとした。

薬剤感受性試験：CTX、CTRX、CPDX、CAZ、AZT、CEZ、CPR、CMZ、FMOX、ABPC、IPM、AMK、GM、LVFX、MINO、FOM、ST、PIPC/TAZの18剤について、ディスク拡散法により薬剤感受性試験を実施した。

パルスフィールドゲル電気泳動(PFGE)：制限酵素*Xba*Iを用いて常法により実施し、BioNumerics7.5によりUPGMA法を用いてDNAの切断パターンを比較した。

成績

ESBL 産生大腸菌の分離：豚では 6 農場 19 頭（農場：26.1%、頭数：17.8%）から 19 株、牛では 6 農場 8 頭（12.5%、12.7%）から 8 株の ESBL 産生大腸菌を分離した。豚の農場別分離率は、農場 A 100%、農場 B 57.1%、農場 C 50%、農場 D-1、E 33.3%、農場 D-2 20%であった。牛の農場別分離率は農場あたりの分離頭数が少ないため、算出しなかった。

ESBL 遺伝子型別：ESBL 遺伝子については、豚由来 19 株(100%)すべてが CTX-M 型、うち 6 株(31.6%)が TEM 型であった。また、牛由来の 8 株中 6 株(75.0%)が CTX-M 型、7 株(87.5%)が TEM 型であった。SHV 型は、牛豚いずれにおいても検出されなかった。

CTX-M 型別は、豚由来株において CTX-M-55 が 6 株(31.8%)、CTX-M-1 が 5 株(26.3%)、CTX-M-15 が 3 株 (15.8%)、CTX-M-14 が 3 株 (15.8%)、CTX-M-65 が 2 株 (10.5%) であった。また、牛由来においては、CTX-M-14 が 2 株 (25.0%)、CTX-M-15 が 2 株 (25.0%)、CTX-M-55 が 1 株 (12.5%)、CTX-M-65 が 1 株 (12.5%) であった。

O 群血清型別試験：豚由来 19 株中 4 株が O169 に型別され、その他の菌株は OUT であった。牛由来 8 株はすべて OUT であった。

薬剤感受性試験： β -ラクタム系に対する薬剤耐性状況は、CEZ、CTX、CPDX、CTRX、ABPC に対してはすべて耐性であった。CAZ(3 株)、CPR(21 株)、AZT(9 株)に対しては一部耐性であったが、CMZ、FMOX、IPM に対してはすべて感受性であった。非 β -ラクタム系薬剤については、ST(11 株)、GM(11 株)、LVFX(7 株)、MINO(5 株)、FOM(4 株)に対して一部耐性となったが、AMK、PIPC/TAZ に対してはすべて感受性であった(図 1)。

PFGE 解析：豚由来 17 株、牛由来 6 株において、複数のバンドが確認され、解析可能な泳動像が得られた。一方、豚由来 2 株および牛由来 2 株については、泳動像がスメア状となり解析不能であった。解析可能な 23 株について、バンドパターンの類似度 60%以上で分類した結果、13 のグループに分類可能であった。同一グループに分類された株は、畜種、血清型、遺伝子型が完全に一致しており、農場および薬剤耐性パターンについても概ね一致していた(図 1)。

考察

ESBL 産生大腸菌の保菌率については、国内では過去に豚、牛ともに 4%と報告されているが [5]、本調査では豚で 17.8%、牛で 12.7%と高い保菌率であった。また、豚の農場別分離率については、農場により分離率が大きく異なる結果となり、分離率の高い農場では、飼養環境中に ESBL 産生大腸菌が広く拡散しているものと思われた。

ESBL 遺伝子については、TEM、CTX-M-1group に属する CTX-M-1、15、55、CTX-M-9group に属する CTX-M-14、65 と、6 種類の ESBL 遺伝子が検出され、国内の人における臨床研究報告 [6] と一致する結果となった。一方、他県の調査と比較して豚では CTX-M-1 型が多く分離されるなど、新たな知見も得られた [5、7]。

血清型別試験では、豚分離株 4 株が国内の豚で報告されていない O169 であった。

薬剤感受性試験は、非β-ラクタム系薬剤については、ST、LVFX に対して高い耐性率を示すなど、他県の調査と同様の結果であった [8]。また、27 株中 18 株(66.7%)が非β-ラクタム系薬剤にも耐性を示したことから、抗生物質の慎重使用が必要と思われた。

PFGE 解析では、様々な泳動パターンを示したことから、多様な ESBL 産生大腸菌が県内に分布しているものと考えられた。また、同一グループに分類された株は同一農場もしくは関連農場分離株であり、ESBL 遺伝子型および薬剤耐性パターンが概ね一致していたことから、同一起源の菌株であると考えられ、農場内で同一起源菌株が定着・拡散している可能性が示唆された。

ESBL 産生菌は年々増加傾向にあるため、その動向を今後も注視していく必要がある。

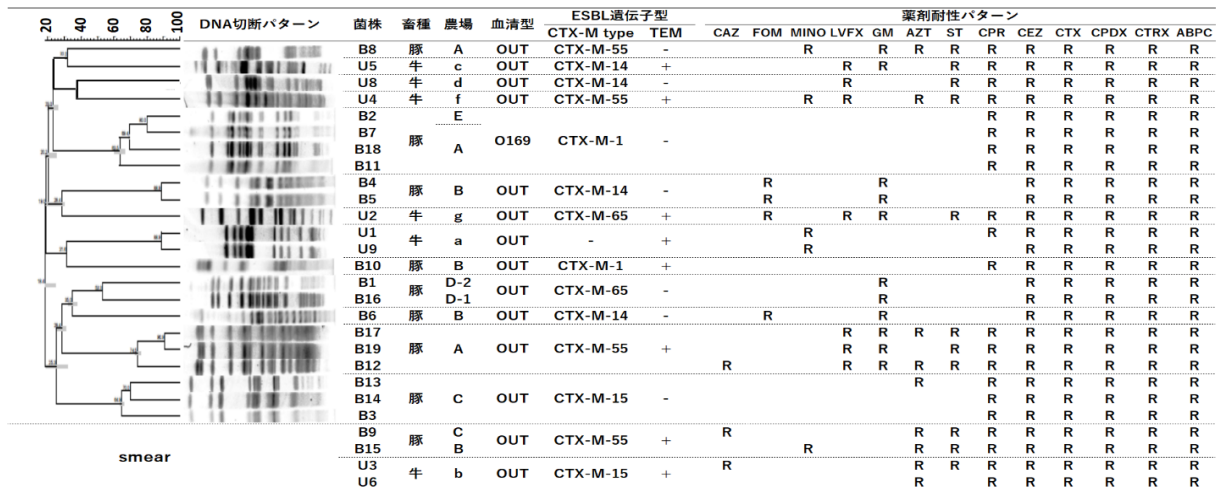


図 1. PFGE 像の系統解析像 (UPGMA 法) および O 血清型、ESBL 遺伝子型、薬剤耐性パターンの組み合わせ

まとめ

今回、長崎県内と畜場搬入家畜における ESBL 産性大腸菌の高い保菌率が明らかとなり、抗生物質の適正使用および衛生的な食肉処理の重要性を再認識する結果となった。今後、農場における飼養状況調査を行うとともに、継続して薬剤耐性菌の保菌状況を注視していきたいと考える。

- (1) J. D. D. Pitout et al : J. Antimicrob. Chemother, 56, 52–59 (2005)
- (2) I. Overdevest et al : Emerging Infectious Diseases, 17(7) , 1216–1222 (2011)
- (3) Shibata N et al : Antimicrob. Agents Chemother, 50, 791–795, (2006)
- (4) Yagi T et al : FEMS Microbiology Letters, 184, 53 (2000)
- (5) 麻生嶋七美 他 : 日食微誌, 29, 215–220 (2012)
- (6) 除村萌 他 : 日臨微誌, 29, 21–27 (2019)
- (7) Norizuki C et al : Jpn J Infect Dis, 71, 33–38 (2018)
- (8) 水谷恵子 他 : 日獣会誌, 72, 117–121 (2019)