

と畜場に搬入された家畜および食鳥処理場に搬入された家禽から分離された
腸内細菌科細菌のβ-ラクタマーゼ遺伝子保有状況

長崎県諫早食肉衛生検査所 ○樋渡 佐知子、橋本 由絹

はじめに

β-ラクタム系薬剤の一つであるカルバペネム系薬剤は多剤耐性菌感染症の治療に用いられる重要な抗菌薬である。近年ではカルバペネム耐性腸内細菌科細菌（以下、CRE）の感染事例が増加傾向にあり、国際的な問題となっている。CREの元となる腸内細菌科細菌は、人のみならず牛、豚および鶏などの家畜等に加えて、犬、猫および野鳥などの腸管内に広く常在するため、食肉や様々な生活環境から薬剤耐性菌が人へ伝播する可能性が指摘されているが、国内における家畜および家禽のカルバペネム系抗菌薬に対する耐性菌の調査報告は少なく、CREの保有状況の解明は今後の重要な課題である。

そこで、畜産分野から人への耐性菌感染および環境汚染のリスク評価の一助とするため、管轄と畜場に搬入された家畜および県内食鳥処理場に搬入された家禽の腸内細菌科細菌におけるカルバペネマーゼ遺伝子を含むβ-ラクタマーゼ遺伝子の保有状況を調査した。

材料及び方法

1 材料

2022年8～9月に管轄と畜場に搬入された牛50頭（3県14農場）および豚85頭（6県20農場）の直腸便、5～9月に「と畜検査員及び食鳥検査員による外部検証の実施について」（令和2年5月28日付生食発0528第1号）に基づいて採取した牛20頭（県内2農場）、豚20頭（県内3農場）、鶏20検体（県内3処理場）の検体懸濁原液を供試した。

2 方法

(1) 菌分離

直腸便または検体懸濁原液を1 μg/ml セフトキシム添加VRBG寒天培地へ塗抹、37℃24時間培養後、典型集落を1～3コロニー選定し、オキシダーゼ試験、OF試験にて腸内細菌科菌群の確認を行った。

(2) β-ラクタマーゼ遺伝子の検出

分離株について、PCR法により各種耐性遺伝子の検出を行った。カルバペネマーゼ遺伝子は、KPC、NDM、IMP、VIM、OXA48〔1〕、基質特異性拡張型β-ラクタマーゼ（以下、ESBL）遺伝子は、TEM、SHV、CTX-M-1 group（以下、G）、CTX-M-2 G、CTX-M-9 G〔2,3〕、プラスミド性AmpC遺伝子は、MOX、CIT、DHA、ACC、EBC、FOX〔4〕を対象とした。

(3) 分離菌株の鑑別

β-ラクタマーゼ遺伝子が検出された菌株について、TSI、LIM、SC、VP、CLIG培地を用い

生化学性状を確認し、菌株を鑑別した。

成績

β -ラクタマーゼ遺伝子は、直腸便では牛で 50 検体中 20 検体 21 株 (40.0%)、豚で 85 検体中 41 検体 47 株 (48.2%)、検体懸濁原液では豚で 20 検体中 2 検体 2 株 (10.0%)、鶏で 20 検体中 10 検体 15 株 (50.0%)、計 85 株より検出された。牛の検体懸濁原液からは耐性遺伝子は検出されなかった。直腸便について農場別では、牛で 14 農場中 6 農場 (42.9%)、豚で 20 農場中 18 農場 (90.0%) から耐性遺伝子が検出された。

β -ラクタマーゼ遺伝子の内訳は、直腸便では、牛で CTX-M-1 G (12 株)、CTX-M-1 G+TEM (3 株)、CTX-M-2 G+TEM (3 株)、TEM (3 株)、豚で、CTX-M-1 G (7 株)、CTX-M-1 G+TEM (6 株)、CTX-M-9 G+TEM (1 株)、TEM (21 株)、SHV (6 株)、TEM+EBC (1 株)、TEM+CIT (1 株)、CIT (3 株)、MOX (1 株)、検体懸濁原液では、豚で SHV (2 株)、鶏で TEM (12 株)、EBC (2 株)、CIT (1 株) であった。AmpC 遺伝子は牛からは検出されなかった。カルバペネマーゼ遺伝子は、いずれの検体からも検出されなかった。

遺伝子が検出された 85 株の菌種は、*Escherichia* spp. が 73 株 (85.9%)、*Enterobacter* spp. が 4 株 (4.7%)、*Klebsiella* spp. が 3 株 (3.5%)、*Serratia* spp. が 2 株 (2.4%)、*Morganella* spp. が 1 株 (1.2%)、*Providencia* spp. が 1 株 (1.2%)、*Yersinia* spp. が 1 株 (1.2%) と推定された。

考察

今回の調査で牛、豚、鶏からカルバペネマーゼ遺伝子は検出されず、現状では家畜および家禽からの CRE の出現リスクは低いと考えられた。

直腸便においては、牛で 40.0%、豚で 48.2% の β -ラクタマーゼ遺伝子保有腸内細菌科細菌が検出された。また、牛で 42.9%、豚で 90.0% の農場から β -ラクタマーゼ遺伝子が検出されており、保有率が 100% の農場が牛で 2 農場、豚で 3 農場存在した。ESBL 遺伝子は、本県における過去の調査結果 [5] と同様に CTX-M-1 G、TEM の検出頻度が高く、今回、新たに ESBL 遺伝子の CTX-M-2 G および SHV、AmpC 遺伝子の EBC、CIT、MOX が検出された。このことから様々な β -ラクタマーゼ遺伝子が飼育環境中に浸淫していることが考えられた。

腸内細菌科細菌の β -ラクタマーゼ遺伝子はプラスミドに組み込まれているものが多く、同種間および腸内細菌科の異なる菌種間に伝播することで重大なリスクとなる恐れがある。今回、調査した AmpC 遺伝子には染色体性のものとプラスミド性のものがあり、*Enterobacter* spp.、*Serratia* spp.、*Citrobacter* spp. などの菌種は染色体性の遺伝子を元来保有しており、プラスミド性の遺伝子は、染色体上に存在する AmpC 遺伝子がプラスミドに転移したと考えられている。今回の調査で *Escherichia* spp. や *Klebsiella* spp. などの染色体上に AmpC 遺伝子を保有しない菌種から AmpC 遺伝子が検出されており、菌種

を超えた遺伝子の拡散が再確認された。

食肉を汚染する薬剤耐性菌は、家畜が食肉処理される過程において家畜由来の薬剤耐性菌による交差汚染が影響すると考えられているが、今回、直腸便およびと体より薬剤耐性遺伝子が検出されたことから、食肉および食鳥処理工程における食肉および食鳥肉の汚染が裏付けられた。と畜場および食鳥処理場においては、糞便由来の薬剤耐性遺伝子が食肉などを汚染するリスクを考慮し、処理工程における消化管内容物の取り扱いに注意するなど衛生管理の徹底が重要である。

今後、分離株について、ESBL 遺伝子の型別、表現型試験等を行い、菌株の疫学的特徴を明らかにするとともに引き続き薬剤耐性遺伝子および薬剤耐性株の動向を調査し薬剤耐性対策に努めていきたい。

まとめ

今回、家畜および家禽からカルバペネマーゼ遺伝子は検出されなかったが、ESBL および AmpC 遺伝子を高率に保有していることが明らかになった。と畜場および食鳥処理場に搬入される家畜および家禽の中には薬剤耐性遺伝子を保有している家畜が存在することを念頭におき、処理工程における衛生管理の徹底が重要である。

[1] Watahiki M, Kawahara R, Suzuki M, Aoki M, Uchida K, Matsumoto Y, Kumagai Y, Noda M, Masuda K, Fukuda C, Harada S, Senba K, Suzuki M, Matsui M, Suzuki S, Shibayama K, Shinomiya H : Jpn. J. Infect. Dis., 73, 166-172 (2020)

[2] 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 : Antimicrob. Agents Chemother., 50, 791-795 (2006)

[3] Yagi T, Kurokawa H, Shibata N, Shibayama K, Arakawa Y : FEMS Microb. Lett., 184, 53-56 (2000)

[4] Pérez-Pérez FJ, Hanson ND : J. Clin. Microbiol., 40, 2153-2162 (2002)

[5] 橋本由絹, 右田雄二, 高木由美香, 山崎省吾 : 令和2年度全国食肉及び食鳥肉衛生研究発表会口頭発表抄録