

食肉由来 *Enterococcus* 属菌の疫学的研究

2007.09

石崎 直人

# 食肉由来 *Enterococcus* 属菌の疫学的研究

東京都健康安全研究センター

微生物部 食品微生物研究科

石崎 直人

Epidemiological Study of Enterococci Isolated from Meat

Naoto Ishizaki

Division of Food Microbiology,

Department of Microbiology,

Tokyo Metropolitan Institute of Public Health

## 目次

要旨	1
英文要旨	5
I 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	
1. 緒言	1 1
2. 材料および方法	1 2
1) 調査対象	1 2
2) VRE の鶏肉からの検出法	1 2
3) 薬剤感受性試験	1 2
4) PCR 法の条件およびアガロースゲル電気泳動法	1 2
5) PCR-RFLP 法の条件	1 3
6) RAPD 法の条件	1 3
7) PFGE 法の条件	1 3
3. 結果	1 3
1) VRE の食肉からの検出状況および薬剤感受性試験	1 3
2) 分子疫学的解析	1 4
PCR-RFLP 法	1 4
RAPD 法	1 4
PFGE 法	1 4
4. 考察	1 4
5. まとめ	1 8
6. 文献	1 8
II 国産および輸入食肉における <i>Enterococcus faecalis</i> と <i>Enterococcus faecium</i> の 汚染状況および分離株の病原遺伝子保有状況	
1. 緒言	2 0
2. 材料および方法	2 1
1) 被検食肉	2 1
2) 食肉からの腸球菌の検出および <i>E. faecalis</i> , <i>E. faecium</i> の同定	2 1
3) <i>E. faecalis</i> および <i>E. faecium</i> の PCR 法による病原遺伝子の検出	2 1
4) PCR 法の条件およびアガロースゲル電気泳動法	2 1
5) ゼラチナーゼ活性および cytolysin 産生試験	2 1
3. 結果	2 2
1) 食肉からの <i>E. faecalis</i> および <i>E. faecium</i> の検出状況	2 2
2) 分離菌株における病原遺伝子の保有状況	2 2
3) <i>gelE</i> または <i>cytA</i> 遺伝子保有株における表現型の発現状況	2 3
4. 考察	2 3
5. 要約	2 4
6. 文献	2 4
謝辞	2 6

## 食肉由来 *Enterococcus* 属菌の疫学的研究

腸球菌は *Enterococcus* 属菌の総称であり、ヒトおよび動物の腸管内に常在する通性嫌気性のグラム陽性球菌である。本菌は食品衛生分野においては、冷凍や加熱に対して大腸菌群のように容易に損傷、死滅しないため、従来から汚染指標菌として位置づけられている。一方、臨床分野ではβ-ラクタム系薬剤やサルファ剤などに自然耐性を示すが病原性は低いと考えられていた。しかし、1980年代後半からバンコマイシン(VCM) に対する耐性を獲得した VCM 耐性腸球菌 (VRE : vancomycin-resistant enterococci) の出現がヨーロッパで報告され、薬剤耐性菌として注目されるようになってきた。さらに、VRE 以外の腸球菌も特に免疫力の低下した易感染者に危害を及ぼす可能性が憂慮されている。腸球菌の中でも *Enterococcus faecalis* や *Enterococcus faecium* は、ヒトの疾病との関わりが考えられる病原因子を保有する株のあることが報告され注目されている。そこで、本菌のヒトへの感染源に関する基礎的研究として、特に国産および輸入鶏肉における VRE の汚染状況を調べて疫学的解析を行うと共に、国産および輸入食肉における腸球菌の汚染状況と病原遺伝子保有状況について検討した。その概要は以下の通りである。

1) 東京都内で購入した国産鶏肉 56 件および輸入鶏肉 32 件 (ブラジル産 11 件、中国産 8 件、米国産 8 件、タイ産 5 件) の計 88 件を対象に VRE の汚染実態を調べた結果、19 件 (21.6%) から本菌が分離された。その内訳は、VanA 型 VRE が 3 件、VanC 型 VRE が 16 件であった。VanA 型 VRE が分離された鶏肉はいずれも輸入鶏肉で、ブラジル産 1 件 (9.1%) とタイ産 2 件 (40.0%) であった。VanC 型 VRE が分離された鶏肉は、輸入が 5 件 [中国産 1 件 (12.5%) およびブラジル産 4 件 (36.4%)], 国産鶏肉が 11 件 (19.6%) であった。

2) 分離された VRE19 株について菌種型別を行ったところ、VanA 型のブラジル産由来の 1 株は *E. faecium*, タイ産由来の 2 株は *E. faecalis*, VanC 型の 16 株は全て *E. gallinarum* であった。

3) VRE19 株について VCM とテイコプラニン (TEIC) の薬剤感受性試験を行い、MIC 値を測定した結果、VanA 型の VRE 3 菌株は VCM に対して 256 $\mu$ g/ml 以上の高度耐性を示したが、TEIC に対しては 6 $\mu$ g/ml 以下の感受性を示した。VanC 型の VRE 16 菌株は、VCM に対して 6 $\mu$ g/ml 以下の低度耐性を示し、TEIC に対しては 0.94 $\mu$ g/ml 以下の感受性を示すことが明らかになった。

4) これらの菌株について、pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) 法、random amplified polymorphic DNA (RAPD) 法、PCR-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) 法を用いて分子疫学的解析を行った。ApaI および SmaI の制限酵素を用いた PFGE 法による解析では、VanA 型 VRE であるタイ産鶏肉由来の 2 株は類似したパターンを示したが、ブラジル産鶏肉由来株とは異なるジェノタイプの株であることが明らかになった。さらに VanC 型 VRE では、国産および輸入鶏肉由来株は全て異なったパターンを示した。この様に、ApaI および SmaI を用いた PFGE 法は疫学解析に有効であることも明らかとなった。

5) 次に、プライマー AP40, AP41, OPA2, OPA3, OPA8, OPA9 を用いた RAPD 法による分子疫学的解析を行った。VanA 型 VRE であるタイ産鶏肉由来 2 株は、AP40 プライマーでは 11 本、AP41 プライマーでは 10 本、OPA8 プライマーでは 4 本、そして OPA9 プライマーでは 6 本の DNA 断片が認められる全く同一の RAPD パターンを示した。一方、ブラジル産鶏肉由来の *E. faecium* 99T7-1 株は、AP40 プライマーでは 5 本、AP41 プライマーでは 6 本、OPA8 プライマーでは 3 本、OPA9 プライマーでは 4 本の DNA 断片が認められる RAPD パターンを示し、タイ産鶏肉由来の 2 株とは異なるジェノタイプであることが明らかとなった。VanC 型 VRE のうちブラジル産鶏肉由来 4 株は、AP40 プライマーで 3 パターン、OPA2 プライマーで 2 パターンにそれぞれ識別され、中国産鶏肉由来株とは異なるパターンを示した。国産鶏肉由来 11 株は、AP40 プライマーで 5 パターン、OPA3 プライマーで 10 パターンにそれぞれ識別されることが明らかになった。PFGE 法同様、RAPD 法も疫学解析に有効な方法であることが示唆された。

6) *vanA* および *vanC* 領域を増幅して解析する PCR-RFLP 法を用いて解析を行った結果、輸入鶏肉から分離された VanA 型 VRE3 株は制限酵素 *Bam*HI, *Hinc*II および *Pst*I で 2 本, *Msp*I では 4 本に切断され、同一の RFLP パターンを示した。VanC 型 VRE は, *Hinc*II では 2 本または 3 本の 2 群に, *Msp*I では 3 本または 4 本の DNA 断片が認められる 2 群に識別された。 *Sal*I では, 16 株の全てが 2 本に切断され同一のパターンを示した。

7) 次に、東京都内で 2005 年から 2006 年に購入した国産食肉 153 件および輸入食肉 36 件の合計 189 件を対象に、腸球菌の汚染状況について調べた結果、*E. faecalis* は国産食肉から 113 件 (73.9%), 輸入食肉 26 件 (72.2%), *E. faecium* は国産食肉 13 件 (8.5%), 輸入食肉 3 件 (8.3%) から分離され、国産食肉、輸入食肉いずれも *E. faecalis* に高率に汚染されていることが明らかとなった。

8) 食肉から分離された腸球菌について gelatinase (*gelE*) 遺伝子, aggregation substance (*asaI*) 遺伝子, cytolysin (*cyl*) 遺伝子, enterococcal surface protein (*esp*) 遺伝子の状況を PCR 産物の有無により検討した。国産食肉由来の *E. faecalis* およびは *E. faecium* では, それぞれ 97 件 (63.4%)と 1 件 (0.7%)で, 輸入食肉由来 *E. faecalis* では 26 件 (72.2%) で, 4 つの遺伝子のうちいずれか 1 つの遺伝子の増幅されていることが明らかとなった。

9) *E. faecalis* に認められた PCR 産物の増幅により検出された病原遺伝子のうち, 国産食肉由来 192 株では *gelE* のみが検出された株が 68 株, *gelE* および *asaI* の両遺伝子が検出された株が 59 株, *gelE*, *asaI* および *cylA* の 3 つの遺伝子が検出された株が 17 株であった。一方, 輸入食肉由来 50 株では, *gelE* および *asaI* の両遺伝子が検出された株が 19 株, *gelE* のみが検出された株が 12 株であった。

10) *gelE* または *cylA* 遺伝子の検出された株を用いて, PCR 産物の増幅による遺伝子の検出とその遺伝子の発現状況を検討した結果, *gelE* 検出株のうちゼラチナーゼ産生性を示したものは, 国産食肉では 148 株中 140 株 (94.6%), 輸入食肉では 39 株中 36 株 (92.3%)であった。また, *cylA* 検出株のうち cytolysin 産生性を示した株は, 国産食肉由来の 25 株中 7 株 (28.0%), 輸入食肉由来の 10 株中 6 株 (60.0%)であった。この様に, 必ずしも PCR 産物の増幅による遺伝

子の検出とその発現状況は一致しないことが明らかとなった。

1 1) 次いで、*cylA* 遺伝子が検出された 35 株について、*cyl* オペロンを構成する *cylA*, *cylB*, *cylM*, *cylLs* および *cylLl* 各遺伝子の検出パターンを検討した結果、31 株 (88.6%) で *cylA*, *cylB*, *cylM* および *cylLl* の 4 つの遺伝子が検出されたが、*cylLs* 遺伝子はこれら 35 株ではいずれも認められなかった。なお、4 つの各遺伝子の PCR 産物の増幅が認められた 31 株のうち、表現型としての cytolysin 産生株は 12 株 (32.3%) であった。

1 2) 国産および輸入食肉由来 *E. faecalis* の *cylA* と *esp* の両遺伝子の PCR 産物の PCR 増幅による検出率は低いが、これらは他の病原遺伝子の PCR 産物の増幅が認められた。また、食肉由来の遺伝子検出の際に、*cylA* や *esp* のどちらか一つの遺伝子が PCR によって検出される事例が存在したが、文献的には易感染者由来株においても同様の事例が報告されている。

以上の結果から、VanA 型 VRE が輸入鶏肉から分離され、日本国内において汚染鶏肉が流通していることが確認された。さらに、その汚染国は発展途上国の一部の地域に及ぶことが明らかになった。また、分離菌株について PFGE 法、RAPD 法および PCR-RFLP 法による分子疫学的解析を行った結果、VanA 型 VRE 3 株はそれぞれ異なるジェノタイプであり、起源を異にすることが明らかとなった。一方、国産鶏肉からは VanA 型 VRE は検出されなかった。次に、食肉中に分布する腸球菌の病原遺伝子の状況を PCR 産物の有無によって検討した結果、国産および輸入鶏肉由来の *E. faecalis* は、いずれかの病原遺伝子の増幅が高率に認められることが確認された。さらに、食肉およびヒト臨床由来株に共通して *cylA* または *esp* 遺伝子を増幅する菌株が認められた。これらの結果は、食肉を汚染している VRE や腸球菌が、ヒトへの感染源の一つとして関与する可能性を示すものであり、食品衛生上重要な知見であると考えられた。

## Epidemiological Study of Enterococci Isolated from Meat

Enterococci is the general term of the genus *Enterococcus* and is the facultative anaerobic gram positive cocci present in the intestinal tract of humans and animals. Those organisms are hard to damage or kill by freezing or heating, unlike coliforms, therefore, enterococci has been used as an indicator of fecal contamination in food hygiene.

Enterococci are naturally resistant to many antimicrobials such as beta-lactams and sulfa drugs, but their pathogenicity in nosocomial infection was thought to be low. In the late 1980s, Vancomycin-Resistant Enterococci (VRE) were reported in Europe, and there has since been a remarkable notice in antimicrobial resistance among enterococci. Recently, enterococci other than VRE have been considered as nosocomial pathogens, especially in immune compromised hosts. *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* among the enterococci have been reported and observed to possess virulence factors related with human diseases.

The aim of this study was to investigate the presence of VRE and other enterococci in domestic and imported meats, and the virulence gene of isolates as fundamental research regarding the infectious source in individuals with enterococci. In addition, molecular epidemiological analysis of those isolates using Pulsed-Field Gel Electrophoresis(PFGE), Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD), PCR-Restriction fragment length

polymorphism (PCR-RFLP) was also studied. The summary is as follows.

1) A total of 88 meat samples, including 56 domestic and 32 imported chickens, were investigated for VRE. VRE, including 3 VanA-types and 16 VanC-types, were isolated from 19 samples. VanA-type VRE were detected from 1 Brazilian chicken (9.1%) and 2 Thai chickens (40.0%). VanC-type VRE were detected from 1 Chinese chicken (12.5%), 4 Brazilian chickens (36.4%) and 11 Japanese chickens (19.6%).

2) Among 3 VanA-type VRE, 1 strain from Brazilian chickens was identified as *E. faecium*, 2 strains from Thai chickens were *E. faecalis*, and 16 strains of VanC-type VRE were identified as *Enterococcus gallinarum*.

3) The MIC (minimum inhibitory concentration) of vancomycin and teicoplanin against 19 VRE isolates was studied. Three strains of VanA-type strains were high-level resistant to vancomycin (>256µg/ml) and susceptible to teicoplanin (<6µg/ml). Sixteen strains of VanC-type VRE were low-level resistant to vancomycin (<4µg/ml) and susceptible to teicoplanin (<0.94µg/ml).

4) For the molecular epidemiological analysis of 19 strains of VRE, genetic diversity was studied by PFGE, RAPD, PCR-RFLP. PFGE analysis using restriction enzyme *ApaI* and *SmaI* showed that 2 strains of VanA-type VRE from Thai chickens were similar but distinguishable from Brazilian strains. Furthermore, all

VanC-type VRE strains isolated from domestic and imported chickens had individual patterns. Those results revealed that PFGE analysis using *ApaI* and *SmaI* was an effective method for epidemiological study.

5) Molecular epidemiologic analysis was also performed by RAPD method using 6 kinds of primers, AP40, AP41, OPA2, OPA3, OPA8 and OPA9. Among 3 strains of VanA-type VRE, 2 strains from Thai chickens showed identical RAPD patterns with 4-11 DNA fragments by 4 kinds of primers, respectively. On the other hand, 1 strain from a Brazilian chickens showed a different RAPD pattern. These results indicate different genotypes between strains from Thai and Brazilian chickens. Among 16 strains of VanC-type VRE, 4 strains from Brazilian chickens and 1 strain from Chinese chickens showed different RAPD patterns. Domestic strains had 5 or 10 RAPD patterns with 2 kinds of primers, respectively. Those results suggested that the RAPD method was as effective in epidemiological analysis as the PFGE method.

6) The PCR-RFLP method, which amplifies and analyzes *vanA* and *vanC* DNA regions, was performed. Three VanA-type VRE strains showed identical RFLP patterns to DNA of 3 strains cleaved into 2 DNA fragments by restriction enzyme *BamHI*, *HincII* and *PstI*, respectively, and 5 DNA fragments by *MspI*, respectively. Sixteen strains of VanC-type VRE were cleaved into 2 DNA fragments groups by restriction enzyme *HincII*, or *MspI*, respectively, but all 16 VRE strains showed an identical pattern by *SalI*.

7) A total of 189 meat samples, including 153 domestic and 36 imported meats, purchased in Tokyo between 2005 and 2006, were subjected to the isolation of *E. faecalis* and *E. faecium*. *E. faecalis* was detected from 113 samples (73.9%) of domestic meat and 26 samples (72.2%) of imported meat. *E. faecium* was detected from 13 samples (8.5%) of domestic meat and 3 samples (8.3%) of imported meat.

8) To study potential virulence factors of those isolates, the presence of genes, i.e. gelatinase (*gelE*), aggregation substance (*asa1*), cytolysin (*cylA*), enterococcal surface protein (*esp*), was examined by PCR. *E. faecalis*, which possessed any one of these four virulence genes, was detected from 97 (63.4%) domestic meats and 26 (72.2%) imported meats, whereas *E. faecium*, which possesses any one of these virulence gene, was detected from only one sample of domestic meat.

9) Among 192 strains from domestic meat, 68 strains detected only *gelE*, 59 strains detected both *gelE* and *asa1*, 17 strains detected three genes such as *gelE*, *asa1* and *cylA*. Among 50 strains isolated from imported meat, 19 strins detected both *gelE* and *asa1*, and 12 strains detected only *gelE*.

10) The production of gelatinase or cytolysin in strains harboring *gelE* or *cylA* gene were examined. Among *gelE* possessing strains, 140 (94.6%) of 148 strains from domestic meat and 36 (92.3%) of 39 strains from imported meat produced gelatinase, respectively. On the other hand, among *cylA* possessing strains, 7 (28.0%) of 25

strains from domestic meat and 6 (60.0%) of 10 strains from imported meat produced cytolysin. There was not always a relationship between gene possession and the expression of the characteristic.

11) The possession pattern of *cylA*, *cylB*, *cylM*, *cylL<sub>S</sub>* and *cylL<sub>L</sub>* genes, which consisted of the *cyl* operon, was examined for 35 *cylA* positive strains. Thirty-one strains (88.6%) harbored *cylA*, *cylB*, *cylM* and *cylL<sub>L</sub>*, but no strains harbored *cylL<sub>S</sub>*. Furthermore, among 31 strains possessing the *cyl* gene, 12 strains (32.3%) produced cytolysin.

12) Although the *cylA* and *esp* gene detection ratio in *E. faecalis* from domestic and imported meat is low, *cylA* or *esp* positive strains always detected the other virulence gene simultaneously. In addition, the strains which detected either gene of *cylA* or *esp* were isolated from meat, and the similar strains were reported to be isolated from compromised hosts origin.

In conclusion, VanA-type VRE were detected from imported chicken although countries exporting VRE contaminated chicken were limited, and the contaminated chicken had already been distributed throughout the country. According to molecular epidemiological analysis using PFGE, RAPD and PCR-RFLP, the three strains of VanA-type VRE isolated from imported chickens had different genotypes and origins. On the other hand, VanA-type VRE was not detected from domestic chicken in these studies. Studies about virulence gene possession in enterococci isolated from meats, *E.*

*faecalis* from domestic and imported meat, showed several virulence genes at a high rate. Furthermore, *cylA* or *esp* gene possessing strains which were recognized in clinical strains were also isolated from meats. These results suggested that VRE and enterococci which contaminate meats have the possibility to be sources of human nosocomial infection, which is an important finding with respect to food hygiene.

## 謝辞

本研究を行うにあたり、御懇篤な御指導、御高配を賜りました麻布大学大学院環境保健学研究科 福山正文教授に深甚なる謝意を表します。また、御懇切な御高閲を賜りました松田基夫教授および山本静雄教授に深謝いたします。さらに御懇切な御教示を賜りました古畑勝則准教授に深謝いたします。

また、本研究に貴重な御指導と御助言を賜りました東京都健康安全研究センター微生物部 山田澄夫博士（現 日本生活協同組合連合会）、矢野一好博士、甲斐明美博士、金子誠二博士ならびに関係各位に深甚なる謝意を表します。