

原 著

鶏肉から分離された基質特異性拡張型 β -ラクタマーゼ (ESBL) 産生大腸菌

永井佑樹, 岩出義人*, 赤地重宏, 小林隆司

Extended-Spectrum- β -Lactamase (ESBL) producing *Escherichia coli* Isolated from Chicken Meat

Yuhki NAGAI, Yoshito IWADE, Shigehiro AKACHI and Takashi KOBAYASHI

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 -Lactamase: ESBL) 産生菌の増加が問題となっている。そこで今回、県内で流通する鶏肉における ESBL 産生大腸菌の検出ならびに遺伝子型別を実施した。ESBL 産生大腸菌は、国産鶏肉 12 検体中 4 検体、輸入鶏肉 5 検体中 3 検体の計 7 検体から検出され、国産鶏肉からは、CTX-M-1, CTX-M-15, 輸入鶏肉からは CTX-M-2 型の ESBL 産生大腸菌がそれぞれ分離された。感受性試験では、輸入鶏肉由来株で耐性薬剤数が平均 7.3 薬剤となり、国産鶏肉由来 (平均 3.3 薬剤) に比べ多剤耐性化傾向が強いことが明らかとなった。ESBL 産生菌は、臨床上のみならず感染症対策および食品衛生行政上においても重要な課題であり、今後もその動向を監視していくことが重要であると思われる。

キーワード: Extended-Spectrum- β -Lactamase (ESBL), 大腸菌, 鶏肉, 薬剤耐性菌

はじめに

ESBL (基質特異性拡張型 β -ラクタマーゼ) は、主にペニシリン系薬を分解するクラス A の β -ラクタマーゼ遺伝子に変異が起こり、アミノ酸置換によりセフォタキシム (CTX) やセフトアジジム (CAZ) 等の第三世代セファロスポリンやモノバクタム系薬のアズトレオナム (AZT) をも分解する能力を獲得した β -ラクタマーゼである。ESBL を産生する菌は、1983 年にドイツで初めてセラチア菌と肺炎桿菌で報告され¹⁾、国内では 1995 年に大腸菌で初めて報告された²⁾。第三世代セファロスポリン系薬は、医療現場で広く使用されているため、ESBL 産生菌は院内感染原因菌としても、市中感染原因菌としても重要な問題となっている。

ESBL にはさまざまな遺伝子型が存在するが、近年は CTX やセフトリアキソン (CTRX) に対して高い耐性を示す CTX-M 型が主流を占めつつある。CTX-M 型は、遺伝子の相同性から主に 4 つの group, 即ち CTX-M-1 group, CTX-M-2 group, CTX-M-8 group および CTX-M-9 group に型別される。

ESBL 産生大腸菌の人への感染源の一つとして食肉、特に鶏肉が重要視されているが³⁾、三重県では食品における ESBL 産生大腸菌の調査報告例はなく、分布状況およびその遺伝子型についても明らかにされていない。そこで今回、三重県内で流通する鶏肉における ESBL 産生大腸菌の分布状況を明らかにするため、ESBL 産生大腸菌の検出ならびに遺伝子型別を試みたので、その結果を報告する。

方 法

1. 被検材料

2013 年 4 月から 7 月にかけて三重県内で購入した鶏肉 17 検体 (国内産 12 検体, 外国産 5 検体) を被検材料とした。

2. 分離と同定方法

鶏肉からの大腸菌の分離は、25g の鶏肉を 225ml のペプトン食塩緩衝液で増菌培養後、EC 培地発酵管 10mL に 1mL および等量をそれぞれ 3 本ずつ、計 6 本に接種し 44.5°C で 24 時間培養した。

*津保健所総合検査室

1) 糞便系大腸菌群の分離

EC 培地においてガス産生が確認された試験管の培養液を 2 μ g/mL の CTX 加 DHL および EMB 寒天培地に画線塗抹し、35 $^{\circ}$ C 24 時間培養後、赤色または金属様光沢を示したコロニーについて大腸菌群陽性とした。

2) ESBL 産生菌の分離

Jarlier の方法⁴⁾に従い、市販の薬剤感受性試験用ディスク (BD) を使用して実施した。すなわち、ミューラーヒントン寒天培地 (栄研) 上にアモキシシリン/クラバン酸 (AMPC/CVA) およびスルバクタム/アンピシリン (S/A) から 25mm 離して、 β -ラクタム系薬剤の CTX, CAZ を配置し、AMPC/CVA, S/A と各薬剤の間に阻止帯 (Fig1) が形成されたものを ESBL 産生陽性と判定した。

3) ESBL 産生菌の同定

分離された ESBL 産生菌は、Api20E (シスメックスピオメリユー) により菌種の同定を行った。

3. ESBL 遺伝子型別

1) PCR 法による ESBL 遺伝子の検出

分離された ESBL 産生菌は、Shibata らの方法⁵⁾に従い TEM, SHV, CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-9 group の ESBL 遺伝子検出を行った。また既報に従い、プラスミド介在性 AmpC- β -ラクタマーゼである CMY-2 をはじめ各種 β -ラクタマーゼの検出も同時に実施した⁶⁻⁸⁾ (Table1)。

2) ESBL 遺伝子の variant 型別

PCR により ESBL 陽性となった検体は、ダイレクトシークエンスにより塩基配列を決定し variant 型別を実施した。シーク

エンスは BigDye Terminators v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) を使用し、3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) により塩基配列を決定した。

4. 薬剤感受性試験

薬剤感受性試験は Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI; 旧 NCCLS) の抗菌薬ディスク感受性試験実施基準に基づき、市販の感受性試験用ディスク (センシディスク, BD) を用いて実施した。供試薬剤は、クロラムフェニコール (CP), テトラサイクリン (TC), ストレプトマイシン (SM), カナマイシン (KM), スルファメトキサゾール・トリメトプリム合剤 (ST), ナリジクス酸 (NA), ノルフロキサシン (NFLX), ゲンタマイシン (GM), ホスホマイシン (FOM), シプロフロキサシン (CPFX), スルフィソキサゾール (Su), イミペネム (IPM) の 12 薬剤とした。

結果

1. 大腸菌群および ESBL 産生菌の検出

鶏肉 17 検体のうち、7 検体 (41.1%) から ESBL 産生菌が分離された。その内訳として国産鶏肉で 12 検体のうち 4 検体 (33.3%), 輸入鶏肉では 5 検体のうち 3 検体 (60.0%) が陽性となった。また陽性となった 7 検体から分離された 34 株 (国産鶏肉由来: 23 株, 輸入鶏肉由来: 11 株) の ESBL 産生菌は、Api20E による同定の結果、全て大腸菌と判定された。

2. ESBL 遺伝子の遺伝子型別

34 株の ESBL 産生大腸菌の遺伝子型別の結果、国産鶏肉由来の 23 株は、いずれも CTX-M-1-group で、輸入鶏肉由来の 7 株は全て CTX-M-2-group であった。輸入鶏肉由来の残りの 4

Table 1. Primers used for PCR and sequencing

Taret	Nucleotide sequence (5'-3')	primer size(bp)	Product size(bp)
TEM-F	CCGTGTCGCCCTTATTCC	18	824
TEM-R	AGGCACCTATCTCAGCGA	18	
SHV-F	ATTTGTCGCTTCTTTACTCGC	21	1051
SHV-R	TTTATGGCGTTACCTTTGACC	21	
CTX-M-1-group-F	GCTGTTGTTAGGAAGTGTGC	20	516
CTX-M-1-group-R	CCATTGCCCGAGGGAAG	18	
CTX-M-2-group-F	ACGCTACCCCTGCTATTT	18	779 or 780
CTX-M-2-group-R	CCTTTCCGCCTTCTGCTC	18	
CTX-M-9-group-F	GCAGATAATACGCAGGTG	18	393
CTX-M-9-group-R	CGGCGTGGTGGTGTCTCT	18	
CTX-M-825-F	CGCTTTGCCATGTGCAGCACC	21	307
CTX-M-825-R	GCTCAGTACGATCGAGCC	18	
OXA-1-F	ATATCTCTACTGTTGCATCTC	21	619
OXA-1-R	AAACCCCTCAAACCATCC	18	
CMY-2-F	AACACACTGATTGCGTCTGAC	21	1226
CMY-2-R	CTGGGCCTCATCGTCAGTTA	20	

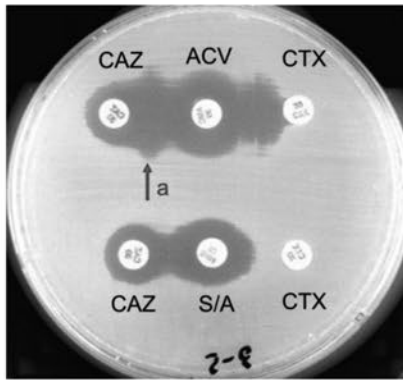


Fig1. Phenotypic test for ESBL producing isolates. Arrows (a) represents ESBL-producing synergy.

Table 2. Antimicrobial resistance profiles of ESBL-producing *E.coli*

Antimicrobial agent	Number of isolates resistant (%)		Total
	Domestic chicken	Imported chicken	
CP	1 (4.3)		1 (2.9%)
TC	23 (100)	11 (100)	34 (100%)
SM	8 (34.8)	11 (100)	19 (55.9%)
KM	3 (13.0)	5 (45.5)	8 (23.5%)
GM		11 (100)	11(32.4%)
ST	8 (34.8)	7 (63.6)	15 (44.1%)
FOM	1 (4.3)	11 (100)	12 (35.3%)
NA	5 (21.7)	5 (45.5)	10 (29.4%)
NFLX	2 (8.7)	4 (36.4)	6 (17.6%)
CPFX	2 (8.7)	4 (36.4)	6 (17.6%)
Su	23 (100)	11 (100)	34 (100%)
IPM			0 (0%)

株に関しては、今回実施した PCR 法では ESBL 遺伝子の保有が確認されなかった。またシーケンスにより variant 型を調査した結果、CTX-M-1-group の 23 株のうち、CTX-M-15 が 2 株、CTX-M-1 が 21 株であった。一方、CTX-M-2-group の 7 株は、型別調査の結果、全て CTX-M-2 のタイプであった。また 34 株中 21 株で TEM 遺伝子陽性となったが、シーケンスの結果、全てプロトタイプの TEM-1 であった。

3. 薬剤感受性試験

ESBL 産生大腸菌 34 株の 12 薬剤に対する耐性菌株数は、CP 1 株 (2.9%)、TC 34 株 (100%)、SM 19 株 (55.9%)、KM 8 株 (23.5%)、GM 11 株 (32.4%)、ST 15 株 (44.1%)、FOM 12 株 (35.3%)、NA 10 株 (29.4%)、NFLX 6 株 (17.6%)、CPFX 6 株 (17.6%)、Su 34 株 (100%)、IPM 0 株 (0%) であった (Table2)。また単剤耐性株はなく、2 剤耐性が 13 株、4 剤耐性が 5 株、5 剤耐性が 2 株、6 剤耐性が 8 株、8 剤耐性が 2 株、9 剤耐性が 4 株であった。また国産鶏肉および輸入鶏肉由来別の耐性薬剤数は、国産鶏肉由来株が平均 3.3 薬剤、輸入鶏肉由来株が、平均 7.3 薬剤であった。

考 察

近年、人および食肉から、ESBL 産生大腸菌の分離報告が増加している。ESBL 産生菌は、現在国内で感染症治療のために広く使われている第三世代セファロスポリン系薬に耐性を示し、特に重篤な基礎疾患や、術後などで免疫力の低下した患者に敗血症、肺炎、尿路感染症などを惹起する場合があります、院内感染原因菌として問題視されている。

日本で ESBL 産生菌が確認されたのは、1995

年が最初であり²⁾、これまでに ESBL 産生大腸菌が分離された動物は、卵用鶏と肉用鶏を含む家禽や牛、豚、家兎などである。これらのうち、特に ESBL 産生菌の検出報告が多い動物は家禽である^{9,10)}。さらに肉用鶏から検出される ESBL 型は、CTX-M 型や TEM 型、SHV 型などでありヒトから検出されるものと同一であるが、現在のところ、肉用鶏から ESBL 産生菌が検出される原因は明らかにされていない。また今回の調査では検出されなかったが、家禽を中心に CMY-2 などクラス C に属するプラスミド介在性 AmpC 産生大腸菌の検出も報告されている⁶⁾。

本研究では、県内で流通する鶏肉における ESBL 産生大腸菌の検出ならびに遺伝子型別を実施し、その分布状況を調査した。その結果、鶏肉 17 検体中 7 検体 (41.1%) から ESBL 産生菌が検出され、国産鶏肉と輸入鶏肉を比較すると、国産鶏肉が 12 検体中 4 検体 (33.3%)、輸入鶏肉が 5 検体中 3 検体 (60.0%) で陽性となり、輸入鶏肉が高い陽性率を示した。また、7 検体から分離された ESBL 産生大腸菌 34 株の遺伝子型は、遺伝子型の判明しなかった 4 株を除いて全て CTX-M 型であり、国産鶏肉では CTX-M1-group、輸入鶏肉では CTX-M-2-group となり、これらの結果は下島ら¹⁰⁾の報告したものと同様の傾向を示した。臨床現場で分離される ESBL 産生菌は、従来、院内感染原因菌として TEM 型および SHV 型の遺伝子を保有する肺炎桿菌や大腸菌が主流であったが、2000 年を境に世界中で CTX-M 型菌の検出頻度が高くなってきている。特に近年は CTX-M-15 型産生大腸菌 O25:H4 ST131 株のパンデミックが報告されている^{11,12)}。今回の調査においても、県内で流通する鶏肉から CTX-M-15 型産生大腸菌が 2 株分離されており、CTX だけでなく CAZ にも耐

性を示していたことから、MLST (Multilocus Sequencing Typing) 解析等詳細な解析が必要である。

ESBL 産生大腸菌の薬剤感受性試験では、平均 4.6 薬剤に耐性を示し、TC および Su に対しては全ての株で耐性を示した。特に輸入鶏肉由来株では、耐性薬剤数が平均 7.3 薬剤となり、国産鶏肉由来の平均 3.3 薬剤に比べ明らかに多く、多剤耐性化傾向が強いことが明らかとなった。なかでも輸入鶏肉由来株は、アミノグリコシド系の SM (100%)、KM (45.5%)、GM (100%) に対して非常に高い耐性率を示した。今回の結果では、ESBL 産生菌治療の第一選択薬であるカルバペネムには全ての株で感受性を示したが、近年カルバペネムを分解する metallo- β -lactamase (MBL) と ESBL を同時に産生する菌も報告されており、今後も警戒が必要である^{13,14)}。

また今回、ディスク法で ESBL 産生菌と判定されながら、PCR により ESBL 遺伝子の保有が確認されなかった大腸菌 (4 株) に関しては、CTX-M-25 や他の薬剤耐性遺伝子を保有している可能性があり、さらに詳細な調査が必要である。

今回分離された CTX-M-1, M-2, M-15 型の ESBL 産生菌については病原性の調査は実施していないが、ESBL 産生菌は、非病原性の大腸菌だけでなく、志賀毒素産生大腸菌 O26 や赤痢菌などでも報告されており^{15,16)}、2011 年に欧州で大規模な outbreak を起こした EHEC O104:H4 も ESBL 産生の CTX-M-15 型であったことが確認されている^{17,18)}。そういったことから、ESBL 産生菌は臨床上のみならず感染症対策および食品衛生行政上においても重要な課題であり、今後さらに薬剤耐性菌の蔓延防止や新たな耐性菌の出現を監視していくことが必要であると思われる。

文 献

- 1) Knothe H, Shah P, Krcmery V, et al (1983): Transferable resistance to cefotaxime, cefoxitin, cefamandole and cefuroxime in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Serratia marcescens*. *Infection*; **11**:315-317.
- 2) Ishii Y, Ohno A, Taguchi H, et al (1995): Cloning and sequence of the gene encoding a cefotaxime-hydrolyzing class A beta-lactamase isolated from *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother*; **39**:2269-2275.
- 3) Doi Y, Paterson DL, Egea P, et al (2010): Extended-spectrum and CMY-type beta lactamase-producing *Escherichia coli* in clinical samples and retail meat from Pittsburgh, USA and Seville, Spain. *Clin Microbiol Infect*; **16**:33-38.
- 4) Jarlier V, Nicolas MH, Fournier G, et al (1988): Extended broad-spectrum beta-lactamases conferring transferable resistance to newer beta lactam agents in *Enterobacteriaceae*: hospital prevalence and susceptibility patterns. *Rev Infect Dis*; **10**:867-878.
- 5) Shibata N, Kurokawa H, Doi Y, et al (2006): PCR classification of CTX-M-type beta-lactamase genes identified in clinically isolated gram-negative bacilli in Japan. *Antimicrob Agents Chemother*; **50**:791-795.
- 6) Pérez-Pérez FJ, Hanson ND (2002): Detection of plasmid-mediated AmpC beta-lactamase genes in clinical isolates by using multiplex PCR. *J Clin Microbiol*; **40**: 2153-2162.
- 7) Colom K, Pérez J, Alonso R, et al (2003): Simple and reliable multiplex PCR assay for detection of blaTEM, bla(SHV) and blaOXA-1 genes in *Enterobacteriaceae*. *FEMS Microbiol Lett*; **223**: 147-151.
- 8) Pitout JD, Hossain A, Hanson ND (2004): Phenotypic and molecular detection of CTX-M-beta-lactamases produced by *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. *J Clin Microbiol*; **42**: 5715-5721.
- 9) 石畝史, 永田暁洋, 鈴木里和 他 (2010): 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解析. *日本獣医公衆衛生学会誌*; **63**: 883-887.
- 10) 下島優香子, 井田美樹, 猪股光司 他 (2011): 食肉からの基質特異性拡張型 β ラクタマーゼ (ESBL) 産生大腸菌の検出. *東京都健康安全研究センター研究年報*; **62**: 145-150.
- 11) Nicolas-Chanoine MH, Blanco J, Leflon-Guibout V, et al (2008): Intercontinental emergence of *Escherichia coli* clone O25 H4 ST131 producing CTX-M-15. *J Antimicrob Chemother*. **61**: 273-281.
- 12) Ewers C, Grobbel M, Stamm I, et al (2010):

- Emergence of human pandemic O25:H4-ST131CTX-M-15 extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* among companion animals. *J Antimicrob Chemother.*; **65**:651-660.
- 13) Ahmad N, Hashim R, Shukor S, et al (2013): Characterization of the first isolate of *Klebsiella pneumoniae* carrying New Delhi metallo- β -lactamase and other extended spectrum β -lactamase genes from Malaysia. *J Med Microbiol*; **62**: 804-806.
 - 14) Dimude JU, Amyes SG (2013): Molecular characterisation and diversity in Enterobacter cloacae from Edinburgh and Egypt carrying bla(CTX-M-14) and bla(VIM-4) β -lactamase genes. *Int J Antimicrob Agents*; **41** :574-577.
 - 15) Ishii Y, Kimura S, Alba J, et al (2012): Extended-spectrum beta-lactamase-producing Shiga toxin gene (Stx1)-positive *Escherichia coli* O26:H11: a new concern. *J Clin Microbiol.* ;**43**: 1072-1075.
 - 16) Andres P, Petroni A, Faccione D, et al (2005): Extended-spectrum beta-lactamases in *Shigella flexneri* from Argentina: first report of TOHO-1 outside Japan. *Int J Antimicrob Agents*; **25**: 501-507.
 - 17) King LA, Nogareda F, Weill FX, et al (2012): Outbreak of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O104:H4 associated with organic fenugreek sprouts, France, June 2011. *Clin Infect Dis*; **54**: 1588-1594.
 - 18) Frank C, Werber D, Cramer JP, et al (2011): Epidemic profile of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* O104:H4 outbreak in Germany. *N Engl J Med*; **365**: 1771-1780.

Extended-Spectrum β -Lactamase (ESBL) producing *Escherichia coli* Isolated from Chicken Meat

Yuhki NAGAI, Yoshito IWADA, Shigehiro AKACHI and Takashi KOBAYASHI

Keywords: Extended-Spectrum β -Lactamase (ESBL), *Escherichia coli*, Chicken meat, Drug resistant bacteria

To evaluate the prevalence of extended-spectrum β -lactamase (ESBL) in broiler chickens, 17 samples taken from commercial chicken meat were examined. ESBL producing *E.coli* were isolated from 4 of the 12 domestic chicken meats, 3 of the 5 imported chicken meats. ESBL genotypes of the 34 strains from 17 samples were examined by PCR and followed by sequencing. ESBL genotypes of domestic chicken isolates were *bla*CTX-M-1 and *bla*CTX-M-15, and those of imported chicken isolates were *bla*CTX-M-2. The drug susceptibility test showed that all strains were resistant to at least two or more antimicrobial agents. Furthermore, imported chicken isolates showed resistant to 7.3 of 12 antimicrobial agents tested on average, which was higher than domestic chicken isolates (3.3 of 12). ESBL producing bacteria has become a serious concern not only clinical practice but also infection control and food sanitation. Therefore, it is important to monitor the spread of drug resistant bacteria among food-producing animal and human origin.