

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

下島 優香子, 井田 美樹, 猪股 光司, 樋口 容子, 高野 智香, 河村 真保,
小西 典子, 畠山 薫, 仲真 晶子, 甲斐 明美

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

Yukako SHIMOJIMA, Miki IDA, Mitsushi INOMATA, Yoko HIGUCHI,
Chika TAKANO, Maho KAWAMURA, Noriko KONISHI, Kaoru HATAKEYAMA,
Akiko NAKAMA and Akemi KAI

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

下島 優香^a, 井田 美樹^a, 猪股 光司^a, 樋口 容子^a, 高野 智香^a, 河村 真保^a,
小西 典子^a, 島山 薫^b, 仲真 晶子^a, 甲斐 明美^c

都内で流通する食肉から基質特異性拡張型β-ラクタマーゼ (ESBL) 産生大腸菌の検出を試みた。ESBL産生大腸菌は国産鶏肉28検体中12検体, 輸入鶏肉19検体中7検体, 牛内臓肉18検体中3検体の計22検体から31株検出された。31株が保有するESBL遺伝子は, 国産食肉由来株ではCTX-M-9及びCTX-M-1 groupが, 輸入鶏肉由来株ではCTX-M-2及びCTX-M-8 groupが多かった。セフトキシム (CTX) に対する薬剤感受性はCTX-M型株は耐性, TEM及びSHV型株は中間を示し, 31株中9株はフルオロキノロン耐性であった。

キーワード: 基質特異性拡張型β-ラクタマーゼ, ESBL, 薬剤耐性菌, 大腸菌, 糞便系大腸菌群, 第三世代セフェム系薬剤, 食肉, 鶏肉

はじめに

基質特異性拡張型β-ラクタマーゼ (Extended-spectrum β-lactamase; ESBL) は, クラスA β-ラクタマーゼの遺伝子に変異が起こり, ペニシリン系薬剤, 第二世代セフェム系薬剤だけでなく, セフトキシム (CTX) やセフトジジム (CAZ) 等の第三世代セフェム系薬剤も分解する能力を獲得したβ-ラクタマーゼを指す。ESBLを産生する菌は, 1983年にドイツで初めて肺炎桿菌とセラチア菌で報告され¹⁾, 国内では1995年に大腸菌で初めて報告された²⁾。第三世代セフェム系薬剤は医療現場で広く使われるため, 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。

従来, 薬剤耐性菌の出現は畜産領域で使用される抗菌剤が一因と考えられてきた。ESBL産生菌についても国内外で肉用鶏のふん便や市販鶏肉からの分離が報告されていることから^{3, 4)}, ESBL産生菌の食肉を介した人への伝播が懸念されている。今回, 都内で流通する食肉からの本菌の検出ならびに遺伝子型別を試みたので, その結果について報告する。

材料と方法

1. 被検材料

2010年5月から7月に, 都内で収去あるいは購入した食肉及び内臓肉計92検体を供試した。その内訳は, 牛肉8検体 (輸入牛肉8検体), 牛内臓肉18検体 (variety meat; 国産牛内臓肉18検体), 豚肉19検体 (国産豚肉5検体及び輸入豚肉14検体), 鶏肉47検体 (国産鶏肉28検体及び輸入鶏肉19検体) である。なお, 輸入鶏肉は全てブラジル産であった。

2. 分離と同定方法

被検材料25 gのペプトン食塩緩衝液による10倍乳剤を3本の2倍濃度EC培地発酵管10 mLに等量加えて44.5°Cで24時間培養した。

1) 糞便系大腸菌群の分離

ガスを産生した試験管の培養液をEMB培地に画線塗抹し35°Cで22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乳糖ブイオン発酵管でのガス産生とグラム陰性桿菌であることを確認し, 糞便系大腸菌群陽性とした。

2) ESBL産生菌の分離

ガスを産生した試験管の培養液を1 µg/mL CTX加マッコンキー寒天培地に画線塗抹し, 35°Cで22時間培養した。発育した乳糖を分解するコロニーについて乳糖ブイオン発酵管でガス産生を確認した後, 下記に示す表現系確認試験により陽性となった菌株をESBL産生菌とした (Fig. 1)。

(1) Double disk synergy test

Jarlerの方法⁵⁾に準じ, 市販の薬剤感受性試験用ディスク (日本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上にアモキシシリン/クラブラン酸 (AMPC/CVA) から25 mm離して, β-ラクタム系薬剤; CTX, セフトリアキソン (CRX), CAZ, アズトレオナム (AZT), セフポドキシム (CPDX) を配置し, AMPC/CVAと各薬剤の間に阻止円の増強が起きたものを陽性と判定した (Fig. 1 A)。

(2) 米国臨床検査標準化協会 (Clinical and Laboratory Standards Institute; CLSI) によるディスク拡散法

CLSIの推奨するディスク拡散法⁶⁾に従って, 薬剤感受

^a 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

169-0073 東京都新宿区百人町 3-24-1

^b 東京都健康安全研究センター微生物部病原細菌研究科

169-0073 東京都新宿区百人町 3-24-1

^c 東京都健康安全研究センター微生物部

169-0073 東京都新宿区百人町 3-24-1

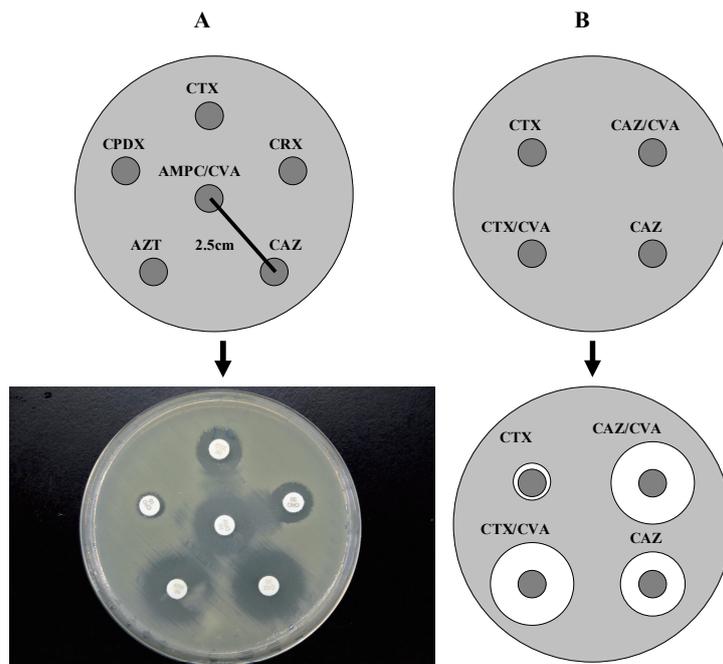


Fig. 1. Phenotypic Tests for ESBL Confirmation

A. Double Disk Synergy Test

B. Disk Diffusion Test by CLSI

性試験用ディスクCTX及びCAZ単剤と、CVAとの合剤（CTX/CVA及びCAZ/CVA）を比較して、CVAとの合剤による阻止円が単剤による阻止円よりも5 mm以上拡張したものを陽性と判定した（Fig. 1 B）。

3) ESBL産生菌の同定

分離されたESBL産生菌は、ウレア、VP、クエン酸、IPA、マロン酸塩、酢酸塩の生化学性状試験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PCR法により、TEM, SHV, CTX-M-1, 2, 8, 9 groupのESBL遺伝子の検出を行った^{7,8)}。1検体から異なるESBL遺伝子を保有する株が分離された場合は、それぞれ1株を供試した。

2) ESBL遺伝子TEM及びSHV型のバリエーション型別

TEM, SHVについては、3-1) で得られたPCR産物のダイレクトシーケンスにより塩基配列を決定し、Lahey Clinicのホームページ⁹⁾を参照してバリエーション型を決定した。プロトタイプであるTEM-1, TEM-2及びSHV-1型はESBL遺伝子から除外した。

4. O血清群別及び毒素産生性試験

大腸菌と同定されたESBL産生菌は、市販の診断用抗血清（デンカ生研）を用いてスライド凝集反応法によりO血清群別を行った。

大腸菌の毒素産生性試験は、リアルタイムPCR法及びPCR法により、ベロ毒素¹⁰⁾、毒素原性大腸菌の易熱性毒素

¹¹⁾及び耐熱性毒素遺伝子¹²⁾の検出を行った。

5. 薬剤感受性試験

β-ラクタム系薬剤としてDouble disk synergy testで使用した5薬剤にアンピシリン（ABPC）を加えた6薬剤、β-ラクタム系以外の薬剤として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）、ゲンタマイシン（GM）、アミカシン（AMK）、ST合剤（ST）、ホスホマイシン（FOM）、ナリジクス酸（NA）、ノルフロキサシン（NFLX）、シプロフロキサシン（CPF）、オフロキサシン（OFLX）、サルファ剤（Su）、イミペネム（IPM）、メロペネム（MEPM）の15薬剤について、感受性試験用ディスク（センシディスク；BD）を用い、KB法で行った⁶⁾。

結 果

1. 糞便系大腸菌群及びESBL産生菌検出状況

食肉及び内臓肉92検体から分離した糞便系大腸菌群及びESBL産生菌の検出状況を、食肉の種類、国産、輸入別にTable 1に示した。食肉92検体のうち66検体（71.7%）が糞便系大腸菌群陽性で、ESBL産生菌は22検体（23.9%）から検出された。

22検体から検出された31株のESBL産生菌は生化学性状により全て大腸菌と同定された。

食肉種類別のESBL産生菌検出状況は、国産鶏肉が28検体のうち12検体（42.9%）、輸入鶏肉が19検体のうち7検体（36.8%）、国産牛内臓肉18検体のうち3検体（16.7%）が陽性であった。牛肉および豚肉からはESBL産生菌は検出されず、糞便系大腸菌群は牛肉8検体中0検体（0%）、豚肉

Table 1. Isolation of Fecal Coliforms and ESBL Producing *E. coli* between May and July, 2010 in Tokyo

Samples	Total No. of samples examined	No. of isolates (%)	
		Fecal Coliforms	ESBL producing <i>E. coli</i>
Domestic variety meat (beef)	18	18 (100)	3 (16.7)
Imported beef	8	0 (0)	0 (0)
Domestic pork	5	2 (40.0)	0 (0)
Imported pork	14	2 (14.3)	0 (0)
Domestic chicken meat	28	28 (100)	12 (42.9)
Imported chicken meat	19	16 (84.2)	7 (36.8)
Total	92	66 (71.7)	22 (23.9)

Imported chicken meats are all from Brazil.

19検体中4検体 (21.1%) で検出され、鶏肉47検体中44検体 (93.6%), 牛内臓肉18検体中18検体 (100%) と比べて低かった。

2. ESBL遺伝子型別

31株のESBL産生大腸菌の遺伝子型をTable 2に示した。国産鶏肉由来の19株は多いものから、CTX-M-9 group 11株、

Table 2. ESBL Genotype

ESBL type	No. of isolates			Total
	Domestic chicken meat	Imported chicken meat	Domestic variety meat (beef)	
TEM (TEM-52)	1			1
SHV (SHV-2a, SHV-12)	1	1		2
CTX-M-1 group	5		3	8
CTX-M-2 group		5		5
CTX-M-8 group		3		3
CTX-M-9 group	11			11
ND	1			1
Total	19	9	3	31

ND: not decided

Imported chicken meats are all from Brazil.

CTX-M-1 group 5株, TEM型 (バリエーション型: TEM-52型) 1株, SHV型 (バリエーション型: SHV-12型) 1株, 型別不能1株の順であった。輸入鶏肉由来の9株は, CTX-M-2 group 5株, CTX-M-8 group 3株, SHV型 (バリエーション型: SHV-2a型) 1株の順であった。国産牛内臓肉由来の3株は全てCTX-M-1 groupであった。

3. ESBL産生大腸菌のO血清群及び毒素産生性

31株のESBL産生大腸菌の遺伝子型とO血清群の関係をTable 3に示した。CTX-M-1 groupの株はO8, O115, 型別不能, CTX-M-2 groupの株はO25, O86a, 型別不能, CTX-M-8 groupの株はO25, O103, 型別不能, CTX-M-9 groupの株はO20, O74, O142, O161, 型別不能, TEM及びSHV型の株は型別不能であった。

また, ベロ毒素, 毒素原性大腸菌の易熱性毒素及び耐熱性毒素産生性は全ての株で陰性であった。

4. ESBL産生大腸菌の薬剤感受性試験

ESBL遺伝子型とβ-ラクタム系薬剤感受性パターンをTable 4に示した。CTX, CRXに対してCTX-M型の株は耐性, TEM及びSHV型の株は中間を示す傾向にあった。CAZに対しては遺伝子型にかかわらず感受性を示す株が多く, CPDX及びABPCに対しては全ての株が耐性であった。AZTに対しては様々な薬剤感受性を示し, 遺伝子型との相関は認められなかった。

ESBL産生大腸菌31株のβ-ラクタム系薬剤以外の15薬剤に対しての薬剤別耐性菌株数は, CP 7株 (22.6%), TC 22株 (71.0%), SM 20株 (64.5%), KM 9株 (29.0%), GM 8株 (25.8%), AMK 0株 (0%), ST 12株 (38.7%), FOM 1株 (3.2%), NA 22株 (71.0%), NFLX 8株 (25.8%), CPFX 8株 (25.8%), OFLX 9株 (29.0%), Su 21株 (67.7%), IPM 0株 (0%), MEPM 0株 (0%) であった (Table 5)。また, 15薬剤全てに感受性の株は2株, 単剤耐性3株, 2剤耐性3株, 3剤耐性7株, 4剤耐性1株, 5剤耐性5株, 7剤耐性2株, 8剤耐性2株, 9剤耐性3株, 10剤耐性2株, 11剤耐性1株であった。

Table 3. ESBL Genotype and O-Serogroup

ESBL type	No. of isolates	O-serogroup	Source
CTX-M-1 group	8	O8, O115, OUT	Chicken meats, variety meats (Japan)
CTX-M-2 group	5	O25, O86a, OUT	Chicken meats (Brazil)
CTX-M-8 group	3	O25, O103, OUT	Chicken meats (Brazil)
CTX-M-9 group	11	O20, O74, O142, O161, OUT	Chicken meats (Japan)
TEM	1	OUT	Chicken meats (Japan)
SHV	2	OUT	Chicken meats (Japan, Brazil)
ND	1	O8	Chicken meats (Japan)

UT: untypable

ND: not decided

Table 4. ESBL Genotype and Antimicrobial Resistance to β -Lactam Antibiotics

ESBL type	Source	No. of isolates	CTX	CRX	CAZ	AZT	CPDX	ABPC
CTX-M-1 group	Japan	5	R	R	S	I	R	R
	Japan	3	R	R	I	R	R	R
CTX-M-2 group	Brazil	5	R	R	S	I	R	R
CTX-M-8 group	Brazil	2	R	R	S	I	R	R
	Brazil	1	R	R	S	S	R	R
CTX-M-9 group	Japan	6	R	R	S	S	R	R
	Japan	3	R	R	S	I	R	R
	Japan	1	R	I	S	S	R	R
	Japan	1	R	R	S	R	R	R
TEM	Japan	1	I	I	S	S	R	R
SHV	Japan	1	I	S	I	I	R	R
	Brazil	1	I	I	S	S	R	R
ND	Japan	1	I	I	S	I	R	R

ND: not decided

R: Resistant, I: Intermediate, S: Susceptible

Table 5. Antimicrobial Resistance of ESBL producing *E. coli* (n=31)

Drug	No. of resistants (%)
CP	7 (22.6)
TC	22 (71.0)
SM	20 (64.5)
KM	9 (29.0)
GM	8 (25.8)
AMK	0 (0)
ST	12 (38.7)
FOM	1 (3.2)
NA	22 (71.0)
NFLX	8 (25.8)
CPFX	8 (25.8)
OFLX	9 (29.0)
Su	21 (67.7)
IPM	0 (0)
MEPM	0 (0)

考 察

都内に流通する食肉92検体のESBL産生菌検出状況を調査した。その結果、ESBL産生菌は牛肉、豚肉からは検出されなかったが、鶏肉からは47検体中19検体（40.4%）、牛内臓肉からは18検体中3検体（16.7%）と高率に検出された。国産鶏肉と輸入鶏肉（全てブラジル産）を比較すると、国産鶏肉が28検体中12検体（42.9%）、輸入鶏肉が19検体中7検体（36.8%）で陽性であり、国産肉がやや高い陽性率であったが、輸入鶏肉の糞便系大腸菌群が検出された検体での陽性率は、43.8%（16検体中7検体）と、国産鶏肉と同等であった。輸入肉における糞便系大腸菌群検出率の低下は凍結状態であったことが一因となったものと考えられた。

22検体から分離されたESBL産生菌31株のESBL遺伝子型は、CTX-M型が27株（87.1%）で大半を占めた。国産鶏肉

ではCTX-M-9 group及びCTX-M-1 groupが、輸入鶏肉（全てブラジル産）ではCTX-M-2group及びCTX-M-8 groupが多く、異なる傾向を示した。

臨床由来のESBL産生菌は、当初欧米では院内感染原因菌としてTEM型及びSHV型のESBL遺伝子を保有する肺炎桿菌が多く分離され¹³⁾、国内ではCTX-M型の大腸菌が問題となっていた^{2,8)}。2000年を境として世界中でCTX-M型菌の検出頻度が高くなってきており、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¹⁴⁾。CTX-M-15型はCTX-M-1 groupに属するが、今回都内に流通する食肉からは検出されず、臨床と食肉の関連性は認められなかった。また、ESBL産生大腸菌のO抗原も多種にわたっており、血清群に偏りは見られなかった。

ESBL産生菌の薬剤感受性は、今回分離された31株全てがペニシリン系薬剤のABPC、第二世代セフェム系薬剤のCPDXに耐性であった。第三世代セフェム系薬剤については、CTX-M型はCTXに対して高度耐性が特徴とされるが⁴⁾、今回分離されたESBL産生菌についても、CTX、CRXに対してはCTX-M型株は耐性、TEM、SHV型株は中間を示す傾向にあった。また、パンデミック株にもなっているCTX-M-15型株はCTX及びCAZともに耐性を示すとされるが、今回分離された株にはCAZ耐性株はなかった。

ESBL産生菌の治療薬は第一選択薬としてカルバペネム系、以下アミノグリコシド系、フルオロキノロン系が推奨されている。今回分離されたESBL産生菌は、カルバペネム系であるIPM、MEPMに対しては全ての株が感受性を示した。アミノグリコシド系については、SMは64.5%、KMは29.0%、GMは25.8%が耐性を示したが、AMKに対しては全ての株が感受性であった。フルオロキノロン系についてはNFLX、CPFX、OFLX3剤に耐性の株が8株（25.8%）、OFLXのみに耐性の株が1株（3.2%）であったが、フルオロキノロン耐性とESBL遺伝子型、O血清群、分離された食肉の産地とは関連性が認められなかった。以上の結果から、食肉を原因としたESBL産生菌感染症が発生した場合、第二選択薬以降の薬剤の選択には注意を払う必要がある。

今回の調査で、都内で流通する鶏肉や牛内臓肉からESBL産生大腸菌が検出されることが明らかとなった。今後も継続した調査が必要であると考えられる。

ま と め

医療現場で広く使われる第三世代セフェム系薬剤に耐性を示すESBL産生菌は臨床問題となっている。都内で流通する牛肉、牛内臓肉、豚肉、鶏肉からESBL産生大腸菌の検出を試みたところ、国産鶏肉28検体中12検体、輸入鶏肉19検体中7検体、牛内臓肉18検体中3検体から、計31株分離された。

31株の保有するESBL遺伝子は、国産食肉由来株ではCTX-M-9及びCTX-M-1 groupが、輸入鶏肉由来株ではCTX-M-2及びCTX-M-8 groupが多く、国産肉と輸入肉で傾

向は異なっていた。

31株の薬剤感受性試験の結果, 9株がフルオロキノロン耐性であり, 食肉を原因としたESBL感染症が発生した場合は選択薬に注意が必要であると考えられた。

謝 辞 本調査を実施するにあたりご協力頂いた当センター広域監視部, 都・区保健所の関係者の皆様に深謝します。

文 献

- 1) Knothe, H., Shah, P., Kromery, V., *et al.*: *Infection*, **11**, 315-317, 1983.
- 2) Ishii, Y., Ohno, A., Taguchi H., *et al.*: *Antimicrob. Agents Chemother.*, **39**, 2269-2275, 1995.
- 3) Warren, R. E., Ensor, V. M., O'Neill, P., *et al.*: *J. Antimicrob. Chemother.*, **61**, 504-508, 2008.
- 4) Kojima, A., Ishii, Y., Ishihara, K., *et al.*: *Antimicrob. Agents Chemother.*, **49**, 3533-3537, 2005.
- 5) Jarlier, V., Nicolas, M. H., Fournier, G., *et al.*: *Rev. Infect. Dis.*, **10**, 867-878, 1988.
- 6) Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Nineteenth Informational Supplement (M100-S19), 2009, Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, USA.
- 7) Yagi, T., Kurokawa, H., Shibata, N., *et al.*: *FEMS Microb. Lett.*, **184**, 53-56, 2000.
- 8) Shibata, N., Kurokawa, H., Doi, Y., *et al.*: *Antimicrob. Agents Chemother.*, **50**, 791-795, 2006.
- 9) Lahey Clinic: β -Lactamase Classification and Amino Acid Sequences for TEM, SHV and OXA Extended-Spectrum and Inhibitor Resistant Enzymes, <http://www.lahey.org/Studies/> (2011年8月3日現在, なお本URLは変更または抹消の可能性があるので)
- 10) Nielsen, E. M. and Andersen, M. T.: *J. Clin. Microbiol.*, **41**, 2884-2893, 2003.
- 11) 伊藤文明, 萩野武雄, 伊藤健一郎, 他: *日本臨牀*, **50**, 343-347, 1992.
- 12) Abe, A., Obata, H., Matsushita, S., *et al.*: *Zentralbl. Bakteriol.*, **277**, 170-178, 1992.
- 13) Perilli, M., Dell'Amico, E., Segatore, B., *et al.*: *J. Clin. Microbiol.*, **40**, 611-614, 2002.
- 14) Canton, R. and Coque, T. M.: *Curr. Opin. Microbiol.*, **9**, 466-475, 2006.

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

Yukako SHIMOJIMA^a, Miki IDA^a, Mitsushi INOMATA^a, Yoko HIGUCHI^a, Chika TAKANO^a, Maho KAWAMURA^a,
Noriko KONISHI^a, Kaoru HATAKEYAMA^a, Akiko NAKAMA^a and Akemi KAI^a

Extended-spectrum β -lactamase-(ESBL) producing *Escherichia coli* (*E. coli*) was examined in 92 meats sold in Tokyo between May and July in 2010. ESBL producing *E. coli* were isolated from 12 of the 28 domestic chicken meats, 7 of the 19 imported chicken meats, and 3 of the 18 domestic variety meats. ESBL genotypes of the 31 strains from 22 meat samples were examined by PCR method. CTX-M-9 group was the most common of 11 strains, followed by CTX-M-1 group of 8 strains in the 22 strains from domestic meats. CTX-M-2 group was the most frequent of 5 strains, followed by CTX-M-8 group of 3 strains in the 9 strains from imported meats. The strains of CTX-M-group showed resistant to cefotaxime (CTX) and ceftriaxone (CRX), and the strains of TEM and SHV showed intermediate to those antibiotics. All of the 31 strains were susceptible to imipenem, meropenem (Carbapenem), and amikacin (an aminoglycoside antibiotic), and 9 of the 31 strains were resistant to fluoroquinolones.

Keywords: extended-spectrum β -lactamase, ESBL, antimicrobial resistance, *Escherichia coli*, fecal coliforms, second-generation cephalosporins, meat, chicken meat

^a Tokyo Metropolitan Institute of Public Health,
3-24-1, Hyakunin-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 169-0073, Japan