

鳥取県内のと畜場における牛・豚の基質特異性拡張型

 β -ラクタマーゼ産生大腸菌の保有状況水谷恵子[†] 織奥真弓 大下幸子 上田 豊

鳥取県食肉衛生検査所 (〒689-3203 西伯郡大山町小竹1291-7)

(2018年3月12日受付・2018年8月23日受理)

要 約

鳥取県内のと畜場に搬入された牛・豚の基質特異性拡張型 β -ラクタマーゼ (ESBL) 産生大腸菌の保有状況を調査した。牛93頭及び豚98頭の盲腸内容物を検体とし、牛では1頭(1.1%)及び豚では27頭(27.6%)からESBL産生大腸菌が分離された。血清型は、牛ではO6が1株、豚ではO143が10株、O25が2株、その他は型別不能であった。ESBL遺伝子は、牛ではCTX-M-1 groupが1株、豚ではCTX-M-1 groupが22株、CTX-M-2 groupが3株及びCTX-M-9 groupが2株であった。豚由来株の薬剤感受性は β -ラクタム系薬剤のほか、フルオロキノロン系に7株が耐性、ホスホマイシンに2株が耐性、ST合剤には6株が耐性を示した。病原性関連遺伝子は、豚由来株1株が*est I*と*est II*を、1株が*est II*を保有していた。本調査により、ESBL産生大腸菌は豚で保有率が高く、この中には多剤耐性を示す株や病原性関連遺伝子を保有する株が含まれていることが明らかになった。

——キーワード：基質特異性拡張型 β -ラクタマーゼ産生大腸菌，豚，病原性関連遺伝子。

-----日獣会誌 72, 117~121 (2019)

β -ラクタマーゼは本来ペニシリン系抗生物質を加水分解する酵素であるが、基質特異性拡張型 β -ラクタマーゼ (Extended-spectrum β -lactamase : ESBL) はペニシリン系、第一・第二世代セフェム系に加え、第三世代セフェム系やモノバクタム系も分解する能力を獲得した酵素である。ESBL遺伝子は、おもにプラスミド上に存在し、菌種を超えて伝達されやすいことから、近年ESBLを産生する菌の分離率が急速に上昇しており、人への感染対策上、極めて大きな問題となっている [1, 2]。また、薬剤耐性菌の伝播は複合的な要因に起因し、畜産食品を介した人への伝播も要因の一つと考えられている [3, 4]。しかし、国内における牛・豚のESBL産生大腸菌保有状況調査は数少なく、近年の動向は明らかではない。そこで、県内における牛及び豚のESBL産生大腸菌の保有状況を明らかにする目的で、と畜場に搬入された牛及び豚からESBL産生大腸菌を分離し、分離菌のESBL遺伝子型及び薬剤感受性を調査し、病原性関連遺伝子などの性状解析を行った。

材料及び方法

材料：平成29年4月から9月に、鳥取県内の農場から管内と畜場に搬入された牛の健康畜65頭及び病畜28頭の計93頭(39農場)、並びに豚の健康畜98頭(20農場)から得られた盲腸内容物を検体とした。

大腸菌の分離：盲腸内容物を4mg/lセフォタキシム(CTX)添加マッコンキー寒天培地に直接塗布し、37℃24時間培養した。大腸菌を疑うコロニーについて、TSI培地でブドウ糖、乳糖及び白糖の発酵、硫化水素産生性を確認し、LIM培地でリジン脱炭酸能及びインドール産生能を確認し大腸菌と同定した。

ESBL確認試験：Clinical and laboratory Standards Institute (CLSI) のドキュメントの基準(M100-S27)に準拠したディスク拡散法に従い、ESBL表現型確認試験を行った。また、ESBL産生大腸菌と確定した菌株について、CTX-M-1 group, CTX-M-2 group 及びCTX-M-9 groupのプライマーを用いて、PCR法によりESBL遺伝子の検出を行った [5]。

[†] 連絡責任者(現所属)：水谷恵子 (一助)生物科学安全研究所)

〒252-0132 相模原市緑区橋本台3-7-11

☎042-762-2775 FAX 042-762-7979

E-mail : k_mizutani@riasbt.or.jp

表1 豚由来株の農場別ESBL産生大腸菌保有率

地域	農場数	陽性農場数	検体数	陽性検体数	陽性率(%)
東部	4	3	18	9	50.0
中部	11	2	55	9	16.4
西部	5	3	25	9	36.0
計	20	8	98	27	27.6

表2 豚由来株ESBL遺伝子型及び血清型

地域	CTX-M-1 group			CTX-M-2 group	CTX-M-9 group
	O25	O143	OUT*	OUT*	OUT*
東部	1	2	5	1	0
中部	0	8	1	0	0
西部	1	0	4	2	2
計	2	10	10	3	2

*OUT: O-antigen untypeable

血清型別試験: ESBL産生大腸菌と確定した菌株は、病原大腸菌免疫血清(デンカ生研株, 東京)によりO抗原血清型別を実施した。

薬剤感受性試験: 豚由来株について薬剤感受性試験を実施した。ペニシリン系1剤: アンピシリン(ABPC 10 μ g), 第一世代セフェム系1剤: セファゾリン(CEZ 30 μ g), 第二世代セフェム系1剤: セフォチアム(CTM 30 μ g), 第三世代セフェム系4剤: セフトジジム(CAZ 30 μ g), CTX(30 μ g), セフポドキシム(CPDX 10 μ g)及びセフトリアキソン(CTRX 30 μ g), 第四世代セフェム系1剤: セフピロム(CPR 30 μ g), モノバクタム系1剤: アズトレオナム(AZT 30 μ g), カルバペネム系2剤: イミペネム(IPM 10 μ g)及びメロベネム(MEPM 10 μ g), アミノグリコシド系1剤: アミカシン(AMK 30 μ g), フルオロキノロン系2剤: レボフロキサシン(LVFX 5 μ g)及びシプロフロキサシン(CPFX 5 μ g), セファマイシン系2剤: セフメタゾール(CMZ 30 μ g)及びセフミノクス(CMNX 30 μ g), オキサセファマイシン系2剤: ラタモキセフ(LMOX 30 μ g)及びフロモキセフ(FMOX 30 μ g), ホスホマイシン系1剤: ホスホマイシン(FOM 50 μ g), ST合剤1剤: スルファメトキサゾール・トリメトプリム(ST 23.75 μ g/1.25 μ g), β -ラクタマーゼ阻害剤配合薬2剤: タゾバクタム・ピペラシリン(TAZ/PIPC 10 μ g/100 μ g)及びクラブラン酸・アモキシシリン(CVA/AMPC 10 μ g/20 μ g)について薬剤感受性キット(センシディスク, 日本ベクトン・ディッキンソン株, 東京及びKBディスク, 栄研化学株, 栃木)を用いてディスク拡散法で行った。

病原性関連遺伝子の検索: 豚由来株について, 病原性関連遺伝子(腸管毒素原性大腸菌関連: *eltA*, *est I*, *est II*, 腸管出血性大腸菌関連: *stx1*, *stx2*, *eaeA*)を既

表3 豚由来株 β -ラクタム系薬剤の薬剤耐性状況(n=27)

薬剤	耐性株数	耐性率(%)
ABPC	27	100.0
CEZ	27	100.0
CTM	27	100.0
CAZ	0	0.0
CTX	27	100.0
CPDX	27	100.0
CTRX	27	100.0
CPR	22	81.5
AZT	3	11.1
IPM	0	0.0
MEPM	0	0.0

表4 豚由来株 β -ラクタム系以外の薬剤耐性パターン及び保有病原性関連遺伝子

薬剤耐性パターン	病原性関連遺伝子	菌株数
LVFX, CPFX	—	5
LVFX, CPFX, FOM	<i>est I</i> , <i>est II</i>	1
LVFX, CPFX, ST	—	1
FOM, ST	<i>est II</i>	1
ST	—	4
計		12

報[6, 7]に従い検索した。

成 績

ESBL産生大腸菌は, 牛及び豚の健康畜からそれぞれ1頭及び27頭分離された。豚では20農場中8農場で保有が認められ, 検体数としては98検体中27検体が陽性で, 陽性率は27.6%であった(表1)。分離株の性状を表2に示す。血清型については, 牛ではO6が1株, 豚から分離された27株はO143が10株, O25が2株で15株は型別不能であった。ESBL遺伝子については, 牛ではCTX-M-1 groupが1株, 豚ではCTX-M-1 groupが22株, CTX-M-2 groupが3株及びCTX-M-9 groupが2株であった。

豚由来株に対する β -ラクタム系薬剤の薬剤耐性状況について表3に示す。ペニシリン系, 第一から第三世代セフェム系薬剤に対しては, CAZを除きすべて耐性であった。第四世代セフェム系, モノバクタム系薬剤には一部耐性を示したが, カルバペネム系にはすべて感性であった。 β -ラクタム系以外の薬剤については, フルオロキノロン系薬剤であるLVFX, CPFXの2剤に耐性を示した株が5株, さらにFOMまたはST合剤の3剤に耐性を示した株がそれぞれ1株ずつ認められた。また, FOM及びST合剤の2剤に耐性を示した株が1株, ST合剤単独に耐性を示した株が4株認められた。一方, アミノグリコシド系など, 他の β -ラクタム系以外の薬剤

については感性を示した (表4).

病原性関連遺伝子については, 豚由来株1株が *est I* と *est II* を, 1株が *est II* を保有していた. (表4).

考 察

国内の牛の ESBL 産生大腸菌の保有率については, Shiraki ら [8] は, 牛 396 頭中 6 頭 (1.5%) から 7 株分離し, 麻生嶋ら [9] は, 牛 100 頭中 4 頭 (4%) から分離している. 一方, 国外では牛 64 頭のうち 11 頭 (17.1%) から ESBL 産生大腸菌が検出されたという報告 [10] がある. 本調査は, 国内の報告と同様の保有率を示した. また, 国内における豚由来の ESBL 産生大腸菌の保有率については, Kojima ら [11] は豚の糞便由来の大腸菌 121 株のうち 1 株 (0.8%) であったとし, 麻生嶋ら [9] は豚 100 頭中 3 頭 (3%) から分離し, Norizuki ら [12] は豚 345 頭中 16 頭 (4.6%) から分離している. また, 国外では, Liu ら [13] は豚の肝臓, 心臓, 糞便由来の大腸菌 203 株のうち 2 株 (1%) であったとし, Geser ら [10] は豚 59 頭中 9 頭 (15.2%) から分離している. これらの報告に比べて本調査の結果は 27.6% と高く, 農場の飼育環境や抗菌剤の使用状況について調査する必要があると思われる.

ESBL 遺伝子については, これまでに国内外の牛及び豚から CTX-M-1 group, CTX-M-2 group 及び CTX-M-9 group が検出されており, CTX-M-1 group が最も多く, 散発的に CTX-M-2 group 及び CTX-M-9 group が検出されている [8-16]. 本調査でも牛で CTX-M-1 group が検出され, 豚でも多くが CTX-M-1 group であることから, このグループが県内に広く分布していることが示唆された. 豚では CTX-M-2 group 及び CTX-M-9 group も散発的に検出され, 以前の報告と同様であったことから, 監視が必要であることが示唆された.

今回豚から検出された O143 及び O25 は, 豚の大腸菌症で多く検出される血清型とは異なり, 豚の腸管内に存在する非病原性大腸菌株であると考えられた [17]. 人への影響としては, 近年, Multilocus Sequence Typing 解析で ST131 に属する CTX-M-15 産生大腸菌 O25:H4 株が世界的に流行している [1, 12]. 本調査では豚由来 2 株が O25 であり, CTX-M-15 が含まれる CTX-M-1 group であったが, 今回 CTX-M-15 の確認はしていないが, LIM 培地で運動性が認められなかったため, H 抗原を有する流行株とは異なるものと考えられた. また, 豚から O143 が 10 株検出されたが, O143 は腸管侵入性大腸菌の代表的血清型である. 腸管侵入性大腸菌のほとんどは, リジン脱炭酸能を欠いており [18], 今回豚から検出された O143 株は, すべてリジン脱炭酸能陽性であった. このことから, 腸管侵入性大腸

菌の可能性は乏しいと考えられた.

β -ラクタム系抗生物質に対する薬剤感受性については, CTX-M 型の典型的な薬剤感受性パターンを示していた. また, 他系統の薬剤に対する感受性については, フルオロキノロン系に対しては耐性遺伝子を保有する ESBL 産生大腸菌が報告されており [1], Norizuki ら [12] は豚の ESBL 産生大腸菌からフルオロキノロン系及び FOM に耐性を示す株を, それぞれ 9.1% 及び 13.6% 検出している. Onishi ら [19] は, 膀胱炎の牛から検出された ESBL 産生大腸菌からフルオロキノロン系及び ST 合剤に耐性を示す株を, それぞれ 10% 及び 70% 検出している. 今回も, 一部の株がフルオロキノロン系, FOM 及び ST 合剤に耐性を示し, フルオロキノロン系では既報よりやや耐性率が高かったことから, フルオロキノロン系薬剤の使用について注意を向けるべきであると考えられた.

また, 病原性関連遺伝子を保有する ESBL 産生大腸菌の存在が報告されており [16, 20], 人や家畜に対して病原性のある菌株に ESBL 遺伝子が伝播する可能性が考えられている. 人や家畜では, ESBL 産生大腸菌が *stx* を保有することはまれとされ [16], 本調査でも *stx* を保有する菌株は検出されなかった. Valat ら [16] の報告では, 下痢や敗血症を呈した牛から分離された ESBL 産生大腸菌 36 株中 2 株が, *est I* を保有していた. 本調査では豚由来株で *est II* 及び *est I* の保有が認められ, これらの菌株は多剤耐性であり, 飼育や宿主環境の変化によっては優位に選択される可能性がある. これらのことから, 今後も豚の ESBL 産生大腸菌の保有状況について継続した監視が必要であると思われる.

引用文献

- [1] 矢野寿一, 平湯洋一, 賀来満夫: 海外における薬剤耐性グラム陰性桿菌の動向, 日化療誌, 59, 8-16 (2011)
- [2] Takesue Y, Kusachi S, Mikamo H, Sato J, Watanabe A, Kiyota H, Iwata S, Kaku M, Hanaki H, Sumiyama Y, Kitagawa Y, Mizuguchi T, Ambo Y, Konosu M, Ishibashi K, Matsuda A, Hase K, Harihara Y, Okabayashi K, Seki S, Hara T, Matsui K, Matsuo Y, Kobayashi M, Kubo S, Uchiyama K, Shimizu J, Kawabata R, Ohge H, Akagi S, Oka M, Wakatsuki T, Suzuki K, Okamoto K, Yanagihara K: Antimicrobial susceptibility of pathogens isolated from surgical site infections in Japan: Comparison of data from nationwide surveillance studies conducted in 2010 and 2014-2015, J Infect Chemother, 23, 339-348 (2017)
- [3] 山本詩織, 朝倉 宏, 五十君静信: 基質特異性拡張型 β ラクタマーゼ (ESBL) 産生菌に関わる最近の動向とその拡散に関する考察 ~食品汚染実態とその危害性について~, 食衛誌, 58, 1-11 (2017)
- [4] Bevan ER, Jones AM, Hawkey PM: Global epidemiology of CTX-M β -lactamases: temporal and geographi-

- cal shifts in genotype, *J Antimicrob Chemoth*, 72, 2145-2155 (2017)
- [5] 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 : PCR classification of CTX-M-type beta-lactamase genes identified in clinically isolated gram-negative bacilli in Japan, *Antimicrob Agents Ch*, 50, 791-795 (2006)
- [6] Chapman TA, Wu XY, Barchia I, Bettelheim KA, Driessen S, Trott D, Wilson M, Chin JJ : Comparison of virulence gene profiles of *Escherichia coli* strains isolated from healthy and diarrheic swine, *Appl Environ Microb*, 72, 4782-4795 (2006)
- [7] Paton AW, Paton JC : Detection and characterization of Shiga toxigenic *Escherichia coli* by using multiplex PCR assays for *stx1*, *stx2*, *eaeA*, enterohemorrhagic *E. coli hlyA*, *rfbO111*, and *rfbO157*, *J Clin Microbiol*, 36, 598-602 (1998)
- [8] Shiraki Y, Shibata N, Doi Y, Arakawa Y : *Escherichia coli* producing CTX-M-2 beta-lactamase in cattle, Japan, *Emerg Infect Dis*, 10, 69-75 (2004)
- [9] 麻生嶋七美, 松田正法, 本田己喜子, 篠原智子, 樋脇弘 : ウシ・ブタ, 市販鶏肉およびヒトから分離された基質特異性拡張型 β -ラクタマーゼ産生大腸菌の性状解析, *日食徴誌*, 29, 215-220 (2012)
- [10] Geser N, Stephan R, Kuhnert P, Zbinden R, Kaeppli U, Cernela N, Haechler H : Fecal carriage of extended-spectrum β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in swine and cattle at slaughter in Switzerland, *J Food Protect*, 74, 446-449 (2011)
- [11] Kojima A, Asai T, Ishihara K, Morioka A, Akimoto K, Sugimoto Y, Sato T, Tamura Y, Takahashi T : National monitoring for antimicrobial resistance among indicator bacteria isolated from food-producing animals in Japan, *J Vet Med Sci*, 71, 1301-1308 (2009)
- [12] Norizuki C, Kawamura K, Wachino JI, Suzuki M, Nagano N, Kondo T, Arakawa Y : Detection of *Escherichia coli* Producing CTX-M-1-Group Extended-Spectrum β -Lactamases from Pigs in Aichi Prefecture, Japan, between 2015 and 2016, *Jpn J Infect Dis*, 71, 33-38 (2018)
- [13] Liu JH, Wei SY, Ma JY, Zeng ZL, Lü DH, Yang GX, Chen ZL : Detection and characterisation of CTX-M and CMY-2 beta-lactamases among *Escherichia coli* isolates from farm animals in Guangdong Province of China, *Int J Antimicrob Ag*, 29, 576-581 (2007)
- [14] Ohnishi M, Okatani AT, Esaki H, Harada K, Sawada T, Murakami M, Marumo K, Kato Y, Sato R, Shimura K, Hatanaka N, Takahashi T : Herd prevalence of *Enterobacteriaceae* producing CTX-M-type and CMY-2 β -lactamases among Japanese dairy farms, *J Appl Microbiol*, 115, 282-289 (2013)
- [15] Van Damme I, Garcia-Graells C, Biasino W, Gowda T, Botteldoorn N, De Zutter L : High abundance and diversity of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing *Escherichia coli* in faeces and tonsils of pigs at slaughter, *Vet Microbiol*, 208, 190-194 (2017)
- [16] Valat C, Auvray F, Forest K, Métayer V, Gay E, Peytavin de Garam C, Madec JY, Haenni M : Phylogenetic grouping and virulence potential of extended-spectrum- β -lactamase-producing *Escherichia coli* strains in cattle, *Appl Environ Microb*, 78, 4677-4682 (2012)
- [17] 中澤宗生 : 大腸菌病, 豚病学, 柏崎 守他編, 第4版, 328-337, 近代出版, 東京 (1999)
- [18] Silva RM, Toledo MR, Trabulsi LR : Biochemical and cultural characteristics of invasive *Escherichia coli*, *J Clin Microbiol*, 11, 441-444 (1980)
- [19] Ohnishi M, Okatani AT, Harada K, Sawada T, Marumo K, Murakami M, Sato R, Esaki H, Shimura K, Kato H, Uchida N, Takahashi T : Genetic characteristics of CTX-M-type extended-spectrum- β -lactamase (ESBL)-producing *Enterobacteriaceae* involved in mastitis cases on Japanese dairy farms, 2007 to 2011, *J Clin Microbiol*, 51, 3117-3122 (2013)
- [20] Ishii Y, Kimura S, Alba J, Shiroto K, Otsuka M, Hashizume N, Tamura K, Yamaguchi K : Extended-spectrum beta-lactamase-producing Shiga toxin gene (*stx*₁)-positive *Escherichia coli* O26:H11: a new concern, *J Clin Microbiol*, 43, 1072-1075 (2005)

Prevalence of Extended-spectrum Beta-lactamase-producing *Escherichia coli*
in Cattle and Swine at a Slaughterhouse in Tottori Prefecture, Japan

Keiko MIZUTANI[†], Mayumi ORIOKU, Sachiko OSHIMO and Yutaka UEDA

*Meat Inspection Center, Tottori Prefecture, 1291-7 Kodake, Daisen-cho, Saihaku-gun, 689-3203, Japan

SUMMARY

We investigated the prevalence of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing *Escherichia coli* in cattle and swine at a slaughterhouse in Tottori Prefecture, Japan. ESBL-producing *E. coli* strains were isolated from the cecal contents in 1 of 93 cattle (1.1%) and 27 of 98 swine (27.6%). The strain isolated from cattle belonged to serotype O6, 10 strains isolated from swine belonged to O143, 2 strains isolated from swine belonged to O25, and others were untypeable. Regarding the ESBL genes of the isolates, 1 isolate from cattle and 22 isolates from swine were classified as the CTX-M-1 group. Of the other isolates from swine, 3 isolates and 2 isolates were classified as CTX-M-2 group and CTX-M-9 group, respectively. As for the antimicrobial susceptibility of the strains isolated from swine, 7 strains, 2 strains and 6 strains were resistant to fluoroquinolones, fosfomycin, and a combination of sulfamethoxazole/trimethoprim, respectively. Regarding the virulence-associated genes of the strains isolated from swine, 1 strain carried both *est I* and *est II*, and 1 strain carried *est II*. The study showed that the prevalence of ESBL-producing *E. coli* was high in swine of Tottori Prefecture and some strains exhibited multidrug resistance or carried virulence-associated genes.

— Key words : Extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli*, swine, virulence-associated genes.

[†] Correspondence to (Present address) : Keiko MIZUTANI (Research Institute for Animal Science in Biochemistry and Toxicology)

3-7-11 Hashimotodai, Midori-ku, Sagami-hara, 252-0132, Japan

TEL 042-762-2775 FAX 042-762-7979 E-mail : k_mizutani@riabst.or.jp

— J. Jpn. Vet. Med. Assoc., 72, 117 ~ 121 (2019)