

市販鶏肉から高率に分離されるフルオロキノロン系薬剤耐性大腸菌

石畝史・山崎史子・村岡道夫*¹・浅田恒夫Fluoroquinolone Resistant *Escherichia coli* Isolated from Chicken Meat on the MarketFubito ISHIGURO, Fumiko YAMAZAKI, Michio MURAOKA*¹, Tsuneo ASADA

福井市内の6量販店で購入した鶏肉64検体から、高率に多剤耐性を示すフルオロキノロン(FQ)耐性菌が分離された。薬剤別にみると、テトラサイクリン、ナリジクス酸およびアンピシリンなど4剤には80%以上、シプロフロキサシンには69%およびカナマイシンには34%にも耐性を示し、使用12薬剤のうち平均6.5剤に耐性を示した。分離株の中で注目されたことは、福井県のヒト由来株でも確認されているFQ耐性のO153:H34およびO153:HNMが異なる産地の5検体から分離された点であった。また、キノロン耐性決定領域における変異およびノルフロキサシンに対する最小発育阻止濃度などから、ヒト由来株と鶏肉由来株の関連性が示唆された。また、FQ耐性株の一部がセフトキシムなどのセフェム系薬剤にも耐性を示した。

1. はじめに

近年、医療現場で使用頻度の高いフルオロキノロン系薬剤に耐性を示す(以下、FQ耐性)大腸菌が国内外において増加傾向にある¹⁾²⁾。当センターでは平成9年より、主に福井市内の2医療機関で分離された散発下痢症患者由来大腸菌のうち、O血清型判明株の病原遺伝子および薬剤感受性などを調べており、その中でFQ耐性株の中で、2株以上分離されている血清型はO153:H34、O153:HNMおよびO25:H4など7種類確認された³⁾⁴⁾。ところで、FQ系薬剤のうち、ノルフロキサシン(NFLX)以外は小児に禁忌であるものの、当センターの調査によれば福井県内の一部の成績ではあるが、FQ耐性株の29%が小児から分離されている。そこで、ヒトへの伝播の可能性を探るために、国外においてFQ耐性菌汚染で問題となっている鶏肉⁵⁾⁶⁾⁷⁾を検査し、FQ耐性菌の分離を試みた。その結果、福井県のヒト由来株で確認されているO153:H34およびO153:HNMが分離されたので、O153を中心にヒト由来株と比較検討した。

2. 材料および方法

2.1 材料

平成19年4~10月に福井市内の6量販店で購入した鶏肉64検体(国内48検体:主に4県産、国外16検体:主にブラジル産)。対象として、福井県の散発下痢症患者由来大腸菌O153:19株およびO25:41株を用いた。

2.2 方法

2.2.1 分離方法

mEC培地で増菌後、分離培地は最初の12検体はDHL培地のみを、後の52検体はシプロフロキサシン(CPFX)を6.4μg/mL添加したDHL培地も併用した。以後は定法により分離し、市販血清(デンカ生研)による血清型別、PCRによる*astA*、*eae*および*aggR*の病原遺伝子の検索を行った。

2.2.2 薬剤感受性試験

市販の感受性試験用ディスク(センシディスク:BBL)を用いたKirby-Bauer法によりアンピシリン(ABPC)、テトラサイクリン(TC)、ストレプトマイシン(SM)、ナリジクス酸(NA)、シプロフロキサシン(CPFX)、スルフィソキサゾール(Su)、ST合剤(SXT)、セフトキシム(CTX)、カナマイシン(KM)、ホスホマイシン(FOM)、クロラムフェニコール(CP)、ゲンタマイシン(GM)の12種類の薬剤感受性を調べた。FQ耐性の30株は米国臨床検査標準委員会標準法の寒天平板希釈法によりCPFX、オフフロキサシン(OFLX)およびNFLXの最小発育阻止濃度(MIC)を測定した。

2.2.3 キノロン耐性領域における変異

FQ耐性の30株について、*gyrA*および*parC*遺伝子のキノロン耐性決定領域(QRDR)における変異を調べた。まず、Giraud⁸⁾の報告に基づきPCRを行い、*gyrA*および*parC*遺伝子の検出を行った。PCR産物は、BigDye Terminator Ver.3.0 Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems)を用いたダイレクトシーケンシング法により、ABI PRISM 377 (Applied Biosystems)で塩基配列を決定した。なお、決定した塩基配列は、wild-type大腸菌*gyrA*(accession number AE000312)および*parC*(AE000384)と比較し、アミノ酸置換の有無を調べた。

*1) 元福井県衛生環境研究センター

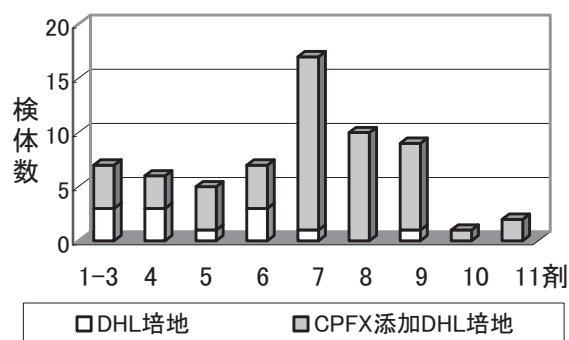


図1 市販鶏肉における多剤耐性大腸菌検出状況

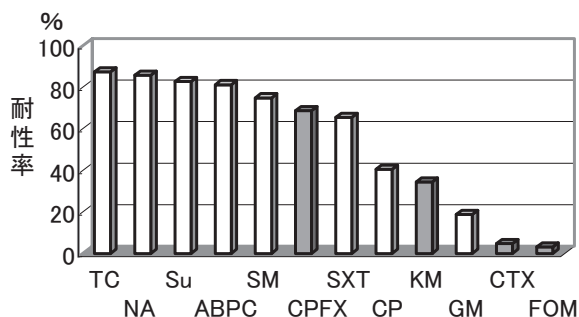


図2 鶏肉由来大腸菌の薬剤別耐性率
(1検体につき1株とした場合)

3. 結果

同一検体から様々な多剤耐性株が分離されたが、1検体につき最も多くの薬剤に耐性を示した1株ずつを集計した。図1のとおり DHL 培地では CPFX を含めた多剤耐性菌が多く分離できなかったが、CPFX 添加培地では予想以上に多剤耐性菌が分離され、最も多く分離されたのは7剤耐性株で、10剤や11剤耐性株も分離された。薬剤別にみると、図2のとおり FQ 系薬剤である CPFX に耐性を示したのは68.8%であった。TC、NA、

Su および ABPC など4剤には80%以上、SM および SXT 薬剤には60~70%、KM には34%が耐性を示し、CTX および FOM などにも耐性を示す株が分離され、平均6.5剤に耐性を示した。代表的な薬剤耐性パターンを示すと、表1のとおりとなった。同一血清型が2検体以上から分離されたのは O153 : H34、O153 : HNM、O8 : H19 および O20 : H5 等で遺伝子保有株は *astA* 保有株が37検体、*eae* 保有株がブラジルの1検体から分

表1 鶏肉由来大腸菌における薬剤耐性パターン(抜粋)

産地	血清型	保有病原因子	NA	CPFX	TC	ABPC	SM	Su	SXT	GM	KM	CP	FOM	CTX
国内産	O8:H5		R*	R	R	R	I	R	R		R	R		R
	O8:H19		R	R	R	R	R	R	R			R		
	O20:H5		R	R	R	R	R	R	R	R	R	R		
	O25:H4				R	R	I	R	R					R
	O78:HNM		R			R	R	R	R			R	R	
アメリカ	O6:H16		R	R	R	R	I	R	R				R	
	OUT:HUT	<i>astA</i> *	R	R	R	R	R	R	R		R	R	I	
	OUT:H21		R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	
ブラジル	OUT:HUT	<i>eae</i> **	R		R	R	R	R		R	R	R	R	R

*R; 耐性 I; 中間の感受性 *腸管凝集接着性大腸菌耐熱性毒素遺伝子 **腸管病原性大腸菌局在性付着因子遺伝子

表2 鶏肉およびヒト由来のフルオロキノロン耐性大腸菌 O153の病原遺伝子保有状況および薬剤耐性パターン
(ヒト由来株は平成17~19年分離株)

由来	血清型	分離年月	鶏肉の産地	保有病原遺伝子	NA	CPFX	TC	ABPC	SM	Su	SXT	GM	KM	CP	CTX	FOM
鶏肉	O153:HNM	2007.5	ブラジル	<i>astA</i> *	R**	R	R	I	R	R		R	R			
	O153:HNM	2007.6	W 県		R	R	R	R	I	R			R	R		
	O153:H34	2007.6	X 県	<i>astA</i>	R	R	R				I	R				
	O153:H34	2007.8	Y 県	<i>astA</i>	R	R	R	R	I	R	I					
	O153:H34	2007.9	Z 県	<i>astA</i>	R	R	R	R	R	R	R	R	R			
ヒト	O153:HNM	2005.2	82		R	R	R	R	R	R	R					
	O153:H34	2006.4	1	<i>astA</i>	R	R	R	R	R	R	R					
	O153:H34	2007.2	75	<i>astA</i>	R	R	R	I	I			R		I		

**astA*; 腸管凝集接着性大腸菌耐熱性毒素遺伝子 **R; 耐性 I; 中間の感受性

表3 鶏肉およびヒト由来フルオロキノロン(FQ)耐性大腸菌における
*gyrA*および*parC*遺伝子の変異と検出頻度およびFQ系薬剤に対する最小発育阻止濃度

Type	株数	アミノ酸置換				最小発育阻止濃度 (MIC) ($\mu\text{g/mL}$)			ヒト由来株 の血清型	
		GyrA		ParC		CPFX	OFLX	NFLX	O153	O25
		83位 Ser*	87位 Asp	80位 Ser	84位 Glu					
1	1	Leu	Gly	Ile	—	16	16	64		
2	2	Leu	Tyr	Ile	—	8, 128	16, 128	32, 512		
3	15	Leu	Asn	Ile	—	8~64	16~64	16~256	13	
4	12	Leu	Asn	Ile	Gly	32~128	32~64	128~256	5	
5		Leu	Asn	Arg	Val				1	
6		Leu	—	Ile	Val					1
7		Leu	Asn	—	Gly					1
8		Leu	Asn	Ile	Val					39

* GyrAの83位のSer(セリン)がLeu(ロイシン)に置換。Asp, アスパラギン酸 Arg, アルギニン
Gly, グリシン Tyr, チロシン Asn, アスパラギン Ile, イソロイシン Glu, グルタミン酸 Val, バリン

離され、そのうち血清型が判明したのはO8:H21、O125:H34およびO119:H4など13種類であった。その中で、国内外の5検体から分離されたO153:H34およびO153:HNHの5株中4株が*astA*を保有しており、4~9剤に耐性を示した(表2)。

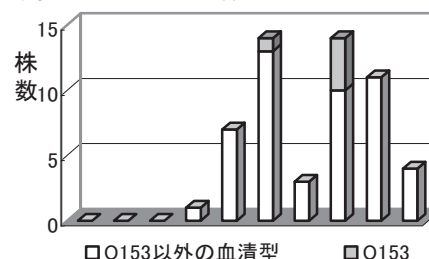
QRDRにおける変異はアミノ酸置換のパターンにより、5株のO153を含むFQ耐性の30株は4類(type1~4)に分類された(表3)。Type3のGyrAの83位のセリンがロイシンへの置換(Ser→Leu、以下同様に示す)と87位の(Asp→Asn)およびParCの80位の(Ser→Ile)の計3ヶ所のアミノ酸置換が15株と最も多く、次いで多かったのはType3の3ヶ所に加えて、ParCの84位の(Glu→Gly)の置換がみられたType4であった。FQ耐性の30株のMIC値は表3のとおりCPFXが8~128 $\mu\text{g/mL}$ 、OFLXが16~128 $\mu\text{g/mL}$ およびNFLXが16~512 $\mu\text{g/mL}$ の範囲であり、NFLXでは32および128 $\mu\text{g/mL}$ をピークとする2峰性を示した(図3)。Type別にみると、4ヶ所の置換がみられたType4が、Type1~3に比べて若干高いMIC値を示す傾向がみられた。

4. 考察

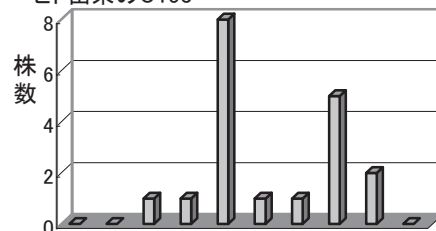
鶏肉から高率に多剤耐性を示すFQ耐性大腸菌が分離された。我々はヒト由来大腸菌O153およびO25が高率にFQ耐性を示し、中でもO153:H34およびO153:HNHの計11株中10

株がFQ耐性を示すこと、さらに多様な薬剤耐性パターンを示すことを報告している(表4)³⁾⁴⁾。その一部は表2に示すとおり、1歳の乳幼児からも7剤耐性株が分離されている。今回、鶏肉から最も多く分離されたのはO8:H19およびO20:H5であるが、ヒトから分離されているO153がそれに次いで多く分離されたことが注目された。産地が異なる5検体由来のO153:H34

鶏肉由来のFQ耐性株



ヒト由来のO153



ヒト由来のO25

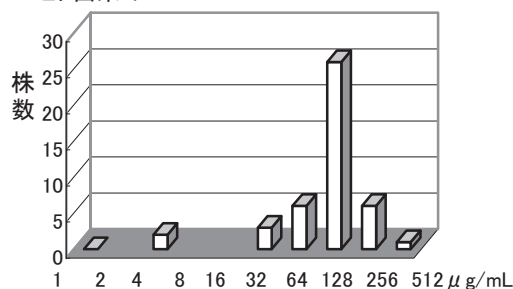


図3 鶏肉由来株およびヒト由来O153、O25における
ノフロキサシンに対する最小発育阻止濃度

表4 ヒトおよび鶏肉由来のフルオロキノロン耐性大腸菌の
血清型および保有病原因子

ヒト由来株 の血清型	分離 株数	保有病原 遺伝子	鶏肉由来株 の血清型	分離 株数	保有病原 遺伝子
O25:H4	33		O8:H19	5	
O1:H6	14		O20:H5	5	
O153:H34	10	<i>astA</i> *	O20:H4	3	
O25:H5	7		O78:H9	3	
O1:H34	4		O153:H34	3	<i>astA</i>
O25:HNH	3		O153:HNH	2	<i>astA</i>
O153:HNH	2	<i>astA</i>	O8:H5	2	
			O20:HNH	2	

**astA*: 腸管凝集接着性大腸菌耐熱性毒素遺伝子

および O153 : HNM の 5 株すべてが CPFEX を含めて 4~9 剤に耐性を示し、異なる薬剤耐性パターンを示した。FQ 耐性の O153 : H34 および O153 : HNM の病原遺伝子は、ヒト由来の 10 株中 6 株（一部は表 2 に示す）、および鶏肉由来の 5 株中 4 株が *astA* 遺伝子を保有し、ともに高い保有率を示した。QRDR のアミノ酸置換では Type 3 が 50% と最も多く、次いで Type 4 の順であった。この Type 3 は松下ら⁹⁾も食肉由来の FQ 耐性菌 25 株（鶏肉由来が 22 株）中 24 株で確認している。一方、国外では Yang ら¹⁰⁾も、中国の罹患した鶏および豚の糞便由来大腸菌の 59% で確認している。また、Saenz ら¹¹⁾もスペインのヒトおよび家畜由来大腸菌において、CPFEX の MIC が $1 \mu\text{g/mL}$ 以上を示した 42% が Type 2 であることを確認している。

一方、ヒト由来 FQ 耐性の O153 の 19 株と O25 の 41 株を調べた結果、O153 が Type 3 が 13 株、Type 4 が 5 株および Type 5 が 1 株³⁾で、O25 は Type 8 が 39 株、Type 6 および 7 が各 1 株⁴⁾で両者のパターンは全く異なったが、鶏肉由来株はヒト由来 O153 と類似したパターンを示した。また、図 3 に示すとおり鶏肉由来株の NFLX の MIC 値は、32 および $128 \mu\text{g/mL}$ に、ヒト由来 O153 は 16 および $128 \mu\text{g/mL}$ にピークを示しともに 2 峰性であるのに対し、O25 は $128 \mu\text{g/mL}$ にピークを示す 1 峰性を示した^{3,4)}。アミノ酸置換と FQ 系薬剤の抗菌力の関連についてヒト由来 O153 の成績³⁾をみると、Type 2 における CPFEX、OFLX および NFLX の MIC は各 $8 \sim 32 \mu\text{g/mL}$ 、 $8 \sim 32 \mu\text{g/mL}$ 、 $16 \sim 256 \mu\text{g/mL}$ であり、今回の成績と同様の結果であった。また、Saenz ら¹¹⁾が示した CPFEX の値 ($4 \sim 64 \mu\text{g/mL}$) とほぼ同様であった。

以上、鶏肉が多剤耐性を示す FQ 耐性株に高率に汚染されていることが明らかになった。中でもヒト由来 FQ 耐性 O153 : H34 および O153 : HNM は、鶏肉由来のそれらと関連性があると推測された。松下ら⁹⁾も食品由来大腸菌において、FQ 耐性菌および基質特異性拡張型 β -ラクタマーゼ (ESBL) 産生菌の検出頻度が近年、急増していると報告している。我々もその後の調査で、FQ 耐性株の一部が ESBL 産生菌であることも判明²⁾しており、鶏肉の取り扱いには充分留意する必要があると思われた。

5. まとめ

1. 市販鶏肉から多剤耐性大腸菌が高率に分離され、使用した 12 薬剤のうち平均 6.5 剤に耐性を示した。
2. 薬剤別に見ると、シプロフロキサシンには 69%、テトラサイクリン、ナリジクス酸など 4 剤には 80% 以上およびカナマイシンには 34% の耐性を示した。
3. 鶏肉から分離されたフルオロキノロン (FQ) 耐性 O153 : H34 および O153 : HNM は、ヒトからも高率に FQ 耐性株として分離される血清型であり、注目された。
4. 鶏肉由来株とヒト由来の O153 は、キノロン耐性決定領域における変異および FQ 系薬剤に対する最小発育阻止濃度が似ており、関連性があると推測された。

謝辞

対象として使用しました散発下痢症患者由来大腸菌を分与下さいました県内医療機関の検査担当者に深謝します。

参考文献

- 1) Oteo J et al : Spanish members of EARSS : Antimicrobial-resistant invasive *Escherichia coli* Spain, Emerg Infect Dis, 11, 546-553 (2005)
- 2) Kuntaman K et al : Fluoroquinolone-resistant *Escherichia coli*, Emerg Infect Dis, 11, 1363-1369, (2005)
- 3) 石畝 史 他 : 散発下痢症患者由来のフルオロキノロン耐性大腸菌における *gyrA* 遺伝子および *parC* 遺伝子の変異, 感染症誌, 80, 507-512 (2006)
- 4) 石畝 史 他 : 散発下痢症由来大腸菌において検出頻度が高いフルオロキノロン耐性 O25 - 福井県, 病原微生物検出情報, 29 (3), 13-14 (2008).
- 5) Johnson JR et al : Antimicrobial-resistant and extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* in Retail foods, J Infect Dis, 191, 1040-1049 (2005)
- 6) Peter Collingnon et al : Fluoroquinolone-resistant *Escherichia coli*: Food for thought, J Infect Dis, 194, 8-10 (2006)
- 7) Tae-Eun Kim et al : Chronological study of antibiotic resistances and their relevant genes in Korean avian pathogenic *Escherichia coli* isolates, J Clin Microbiol, 45, 3309-3315 (2007)
- 8) Giraud et al : Comparative studies of mutations in animal isolates and experimental in vitro- and in vivo-selected mutants of *Salmonella* spp. Suggest a counterselection of highly fluoroquinolone-resistant strains in the field, Antimicrob Agents Chemother, 43, 2131-2137 (1999)
- 9) 松下 秀 他 : 食品由来大腸菌におけるフルオロキノロン系薬剤耐性菌および基質特異性拡張型 β -ラクタマーゼ産生菌の動向, モダンメディア, 54, 10-17 (2008)
- 10) Yang H et al : Characterization of multiple- antimicrobial-resistant *Escherichia coli* isolates from diseased chicken and swine in China, J Clin Microbiol, 42, 3483-3489 (2004)
- 11) Saenz Y et al : Mutations in *gyrA* and *parC* genes in nalidixic acid-resistant *Escherichia coli* strains from food products, humans and animal, J Antimicrob Chemother, 51, 1001-1005 (2003)
- 12) 石畝 史 他 : ヒトおよび鶏肉由来の基質特異性拡張型 β -ラクタマーゼ産生大腸菌の薬剤感受性および β -ラクタマーゼ遺伝子解析, 感染症誌, 82, 317 (2008)