

家畜および食肉から分離されるESBL産生菌

Extended-spectrum β -lactamase producing bacteria from poultry and chicken meats.

東邦大学医学部微生物・感染症学講座 助教 石井 良和
YOSHIKAZU ISHII (Assistant Professor)

Department of Microbiology and Infectious Diseases, Faculty of Medicine, Toho University School of Medicine

1. はじめに

薬剤耐性菌は、病院内あるいは抗菌薬投与中に発症する感染症の原因微生物と考えられている。しかし、耐性菌感染症は健康人にも発症する可能性がある。例えば、市中感染型 (Community acquired: CA) MRSAは、健康人に対しても致死的な感染症を惹起する可能性がある。また、ヨーロッパでは基質特異性拡張型 β -ラクタマーゼ (Extended-spectrum β -lactamase: ESBL)産生大腸菌が健康人の尿路感染症の原因微生物として注目を集めている。本稿では、このESBL産生大腸菌の特徴に関して私見を交えて述べてみたい。

2. ESBLとは

表1にBushおよびJacobyによって提唱された最も新しい β -ラクタマーゼの分類とAmblerの分類を示した¹⁾。 β -ラクタマーゼはAmblerらにより、保存されたアミノ酸配列をもとにA、B、CおよびDの4クラスに分類された。クラスBを除く β -ラクタマーゼは活性中心にセリン残基を有する、いわゆるセリンペプチダーゼである。一方、クラスBに属する酵素は、その活性に2価の金属イオンを必要とする β -ラクタマーゼであることから、メタロ- β -ラクタマーゼとも呼ばれている。一方、Bushらは β -ラクタマーゼの基質特異性や阻害剤に対する反応性などの機能をもとに分類している¹⁾。

ESBLはクラスAおよびクラスDに属する β -ラクタマーゼの中で、オキシイミノセファロスポリン系薬を分解する能力を有する、Bushらが2beに分類した酵素を指す¹⁾。クラ

表1 Bush-Jacobyによって提唱された β -ラクタマーゼの新分類

Bush-Jacobyの 新分類	分子クラス	好適基質	阻害剤		特徴	代表的な酵素名
			クラブラン酸または タリバクタム	EDTA		
1	C	セファロスポリン系薬	無効	無効	ベンジルペニシリンと比較してセファロスポリン系薬をよく分解。セファマイシン系薬も分解	E. coli AmpC, P99, ACT-1, CMY-2, FOX-1, MIR-1
1e	C	セファロスポリン系薬	無効	無効	セフトリジンおよび他のオキシイミノセファロスポリンの分解促進	GC1, CMY-37
2a	A	ペニシリン系薬	有効	無効	ベンジルペニシリンをセファロスポリン系薬と比較してよく分解	PC1
2b	A	ペニシリン系薬、第一世代セファロスポリン系薬	有効	無効	ベンジルペニシリン系薬とセファロスポリン系薬を同程度分解	TEM-1, TEM-2, SHV-1
2be	A	第二世代、第三世代セファロスポリン系薬およびモノバクタム系薬	有効	無効	オキシイミノセファロスポリン系薬の分解促進 (セフトリジン、セフトリアゾラム、セフトリアキサム、セフトラザン、セフトラゾラム、セフトラゾラム)	TEM-3, SHV-2, CTX-M-15, PER-1, VEB-1
2br	A	ペニシリン系薬	無効	無効	クラブラン酸、スリルバクタムおよびタリバクタムに耐性	TEM-30, SHV-10
2ber	A	第二世代、第三世代セファロスポリン系薬およびモノバクタム系薬	無効	無効	オキシイミノセファロスポリン系薬の分解促進およびクラブラン酸、スリルバクタムおよびタリバクタムに耐性	TEM-50
2c	A	カルベニシリン	有効	無効	カルベニシリンの加水分解促進	PSE-1, CARB-3
2ce	A	カルベニシリンおよびセフェム	有効	無効	カルベニシリン、セフェムおよびセフェム類の加水分解促進	RTG-4
2d	D	クロキサシリン	不定	無効	クロキサシリンあるいはオキサシリンの加水分解促進	OXA-1, OXA-10
2de	D	第二世代、第三世代セファロスポリン系薬およびモノバクタム系薬	不定	無効	クロキサシリン、オキサシリンあるいはオキシイミノセファロスポリン系薬の加水分解促進	OXA-11, OXA-15
2e	A	第二世代、第三世代セファロスポリン系薬およびモノバクタム系薬	有効	無効	セファロスポリン系薬を分解。クラブラン酸による阻害を受けず。アミノペニシリン系薬による阻害は受けない	CepA
2f	A	カルバペネム系薬	不定	無効	カルバペネム系薬、オキシイミノセファロスポリン系薬およびセファマイシン系薬の加水分解促進	KPC-2, IMI-1, SME-1
3a	B (サブクラス B1)	カルバペネム系薬	無効	有効	カルバペネム系薬を広く加水分解	IMP-1, VIM-1, CorA, IND-1
	B (サブクラス B3)	カルバペネム系薬	無効	有効	幅広い基質特異性を有するが、モノバクタム系は分解せず	LI, CAU-1
3b	B (サブクラス B2)	カルバペネム系薬	無効	有効	カルバペネム系薬を広く加水分解	CphA, Sfh-1

文献1を改変

スAに属するESBLは、TEM-型やSHV-型、CTX-M-型、VEB-型、GES-型などである。このうち、TEM-型およびSHV-型はESBLおよび非ESBLが混在しており、それらの区別が難しい。クラスAに属する酵素のうち、SME-型、

IMI-型、NMC-型、KPC-型および一部のGES-型β-ラクタマーゼは、カルバペネム系薬を分解する能力を有している。Bushらはこれらの酵素を2fに分類しており、ESBLとは区別している¹⁾。クラスAに属するβ-ラクタマーゼは、その阻害剤であるクラブラン酸やスルバクタム、タゾバクタムを利用して検出することができる。ESBLは例外を除いて、セフトキシムの分解が得意なものと、セフトジジムの分解が得意なもの2種類に分類することができる。したがって、セフトキシム高度耐性ESBL産生株がセフトジジムに感性を示すことや、逆にセフトジジム高度耐性株ESBL産生株がセフトキシムに感性を示すことがある。そのため、セフトキシム高度耐性株にセフトジジムやセフトアマイシン系薬の投与や、セフトジジム高度耐性株にセフトキシムやセフトアマイシン系薬が投与されることがある。しかし、その有効性については疑問視する意見もあり、現時点ではESBL産生菌による重症感染症にはカルバペネム系薬が一次選択薬とされている。

2010年にClinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)によって刊行されたドキュメント(M100-S20)から、セフェム系薬およびカルバペネム系薬のブレイクポイントが改定された²⁾。すなわち、ESBL産生の有無とは関係なく、薬剤感受性試験成績をもとに感染症の治療に用いる抗菌薬が選択されることになる。米国ではCTX-M-型β-ラクタマーゼの検出頻度が低く、米国を除く国々ではCTX-M-型産生株の検出頻度が高い。CTX-M-15を除くCTX-M-型β-ラクタマーゼ産生株は、セフトキシムに高度耐性を示すのに対して、セフトジジムに対する感受性が高いのが特徴である。今後、CLSIが設定したカテゴリー分類をもとに、正しく抗菌薬を選択することが可能か否かの検討が必要であると考えている。

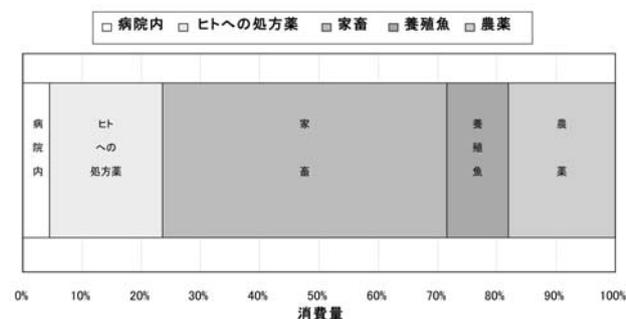


図1 抗菌薬が使用される場所および消費量の内訳

著者らは、ESBLに関して、その臨床上の重要性を鑑みて、CTX-M-型酵素を中心に包括的な研究を進めてきた³⁻¹³⁾。すなわち、疫学的検討から、酵素学的検討および構造生物学的検討の両面から詳細な酵素の反応メカニズムを解明してきた。現在も、CTX-M-44 (Toho-1)を中心に酵素の基質認識機構の解明を進めている¹¹⁾。

3. 抗菌性物質使用とESBL産生菌検出状況との関連性

我々は、現在まで農畜水産領域で用いられる抗菌性物質に対して十分な注意を払っていなかった。図1に示すごとく、ヒトに用いられる抗菌薬と農畜水産物用抗菌薬を比較すると、農畜水産物への使用量は臨床用抗菌薬使用量を凌駕している¹⁴⁾。

環境に生息する微生物は、抗菌性物質にさらされる可能性がほとんどないと考えられる。しかし、抗菌薬の影響がないと考えられるような環境からも抗菌薬耐性因子を保有する菌が分離されている。例えば、Sargasso海からはカルバペネム系薬分解酵素をコードする遺伝子、南極からメタロβ-ラクタマーゼ産生菌、黒潮の南側からセフェム系薬耐性緑膿菌、湖沼からカルバペネム系薬耐性緑膿菌あるいはShewanella属菌がそれぞれ分離されている¹⁵⁻¹⁷⁾。これらの報告は、環境中には薬剤耐性因子をコードする遺伝子がプールされており、それを抗菌性物質の使用が選択・増幅して人体に影響する可能性を示唆するものである。

我々の身の回りの愛玩伴侶動物や家畜の糞便や食肉を汚染する耐性菌についての報告が散見される。本邦でもKojimaらが肉用鶏の便から分離されたESBL産生菌について報告している¹⁸⁾。その分離頻度は卵鶏や豚、牛の便から分離されるESBL産生菌と比較して高かったと述べている。肉用鶏に使用される抗菌薬量は卵鶏の場合と比較して多くない。特に、セフェム系薬は鶏や家禽に対する適応がなく、基本的に使用されることがない。我々は、ESBL産生株の選択に重要と考えられているオキシミノセファロスポリン系薬が全く使用されない鶏からESBL産生株が分離される原因を理解できていない。

4. β-ラクタム系薬

世界各国でESBLを産生する大腸菌やサルモネラ属菌を保菌する家畜についての検討は実施されている。これ

までにESBL産生大腸菌やサルモネラ属菌が分離された動物は、卵鶏と肉用鶏を含む家禽や豚、家兎、牛などである。このうち、特にESBL産生株の検出報告が多い動物は家禽である。さらに肉用鶏から検出されるESBLの型は、CTX-M-型やTEM-型、SHV-型であり、ヒトから検出されているものと同一である。また、家禽を中心に、CMY-2などクラスCに属するプラスミド性AmpC産生大腸菌も検出されている。本邦でもKojimaらは、1999年から2002年に、全国1443農場から収集された大腸菌(合計2747株)を対象としてセファゾリンに対する耐性因子の解析を行った¹⁸⁾。その結果、18株(2.7%)のセファゾリン耐性大腸菌が12農場の肉用鶏から分離された。そのうち、4農場から分離された6株は、オキシミノセファロスポリンに耐性を示したのに対して、セフォキシチンには感性を示した。この結果は、これらの菌株がESBLを産生していることを強く示唆するものであり、著者らは耐性因子の特定を試みた。その結果、これらの菌株が産生するESBLの型はCTX-M-2あるいはCTX-M-18であることを特定した。一方、12株のセファゾリン耐性株は、セフォキシチンに低感受性を示し、セフェピムに対する感受性が維持されていた。この結果は、これらの菌株がAmpC産生株であることを強く示唆するものである。大腸菌は、通常AmpCの産生量が極めて低いことから、Kojimaらはプラスミド性AmpC産生を疑い、その特定を試みた。その結果、8株からCMY-2であることが確認された。残り4株のセファゾリン耐性株を含む8株の大腸菌からはプラスミド性AmpCをコードする遺伝子が検出されず、大腸菌の染色体上に存在するAmpCのプロモータ領域に突然変異が認められ、その産生量が増加した菌である可能性を指摘している。繰り返しになるが、肉用鶏に対してセフェム系薬が使用されることはなく、なぜ使用されてもいない抗菌薬に対する耐性菌が検出されたのかは不明である。

上述のごとく、食肉鶏はCTX-M-型に属するESBLやCMY-2などのプラスミド性AmpC産生大腸菌を保有している。したがって、食用の鶏肉がCTX-M-型やCMY-型β-ラクタマーゼ産生菌によって汚染されている可能性は低いと考えられる。Warrenらは英国内で市販されている鶏肉を購入して、ESBL産生大腸菌の分離を試みている。その結果、129検体中17検体から、CTX-M-1、CTX-M-2、CTX-M-8およびCTX-M-14などのCTX-M-型に属するESBL産生大腸菌が分離された¹⁹⁾。Hasmanらはオラ

ンダで市販されている家禽肉由来のサルモネラ属菌について検討し、TEM-52が検出されたと報告している。TEM-52産生サルモネラ属菌は家禽肉のみならず、オランダ国内の家禽およびヒトからも検出されているが、それらの血清型には違いが認められ、同一起源の菌株が拡散したのではないことが示唆されている²⁰⁾。本邦では、Matsumotoらが中国から輸入された鶏肉について検討し、分離された*Salmonella enterica* serovar Enteritidisがセフォタキシム耐性を示しており、CTX-M-14をコードする遺伝子が本菌株から検出された²¹⁾。

Bertrandらは、ベルギーおよびフランスで飼育されている家禽、家禽肉およびヒトから分離されたCTX-M-2産生*Salmonella enterica* serovar Virchowを対象にパルスフィールドゲル電気泳動法(PFGE)を実施したところ、17株中15株のバンドパターンが一致し、これらは同一起源の株であろうと述べている²²⁾。さらに彼らは、それら15株の中には家禽、家禽肉およびヒト由来株が含まれており、ヒトから分離されたCTX-M-2産生*S. enterica* serovar Virchowは、食品を介して取り込まれた可能性を指摘している。

著者らも健常成人および国産鶏肉からCTX-M-1、CTX-M-2およびCTX-M-9に属するESBLを産生する大腸菌を分離している。2009年において実施した東邦大学医学部医学科の学生実習で、70名の学生の同意を得て便中のESBL産生菌のスクリーニングを実施した。その結果、4名の学生からESBL産生大腸菌が分離された。4株の大腸菌のうち、1株がCTX-M-44(Toho-1)、2株がCTX-M-14、1株がSHV-12を産生していた。彼らの抗菌薬投与歴も調査したが、いずれの学生も3ヶ月以内の抗菌薬の投与歴はなかった。現時点では、調査対象数が少ないため、健常人におけるESBL産生菌保有率を論じることはできない。しかし、少なくともESBL産生菌は健常人も保有していることが明らかとなった(未発表)。

さらに、著者らは鶏肉や肉用鶏の糞便、臨床材料から分離された大腸菌株の血清型、PFGEやMLSTなどによる遺伝子型あるいはプラスミドのレプリコン型についての検討を進めている。現在までの検討から、これらの大腸菌間に明確な関連性は認められていない(未発表)。しかし、CTX-M-型酵素をコードする遺伝子の周辺構造に高い類似性が認められており、現在はこの遺伝子構造および病原因子を含めて詳細な解析を行っている。

5. おわりに

耐性菌は、抗菌薬を投与中あるいは投与後のヒトから検出されると考えられてきた。そのため、ヒトに対する抗菌薬が適正に使用されれば、耐性菌の出現を制御できると信じられてきた。上述の状況から、耐性菌はヒトのみ問題ではなく、食品や家畜、環境から検出される耐性菌にも注目し、その制御のためには総合的な対策が必要になると考えている。

引用文献

- 1) K. Bush, and G. A. Jacoby. An Updated Functional Classification of β -Lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.* (2009).
- 2) Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twentieth Informational Supplement, M100-S-20. CLSI, Wayne. (2010).
- 3) S. Harada, Y. Ishii, and K. Yamaguchi. Extended-spectrum β -lactamases: implications for the clinical laboratory and therapy. *Korean J Lab Med* **28**:401-12. (2008).
- 4) A. Ibuka, A. Taguchi, M. Ishiguro, S. Fushinobu, Y. Ishii, S. Kamitori, K. Okuyama, K. Yamaguchi, M. Konno, and H. Matsuzawa. Crystal structure of the E166A mutant of extended-spectrum β -lactamase Toho-1 at 1.8 Å resolution. *J Mol Biol* **285**:2079-87. (1999).
- 5) A. Ibuka, Y. Ishii, M. Galleni, M. Ishiguro, K. Yamaguchi, J. M. Frere, H. Matsuzawa, and H. Sakai. Crystal structure of extended-spectrum β -lactamase Toho-1: insights into the molecular mechanism for catalytic reaction and substrate specificity expansion. *Biochemistry* **42**:10634-43. (2003).
- 6) Y. Ishii, M. Galleni, L. Ma, J. M. Frere, and K. Yamaguchi. Biochemical characterisation of the CTX-M-14 β -lactamase. *Int J Antimicrob Agents* **29**:159-64. (2007).
- 7) Y. Ishii, S. Kimura, J. Alba, K. Shiroto, M. Otsuka, N. Hashizume, K. Tamura, and K. Yamaguchi. Extended-spectrum β -lactamase-producing Shiga toxin gene *Stx1*-positive *Escherichia coli* O26:H11: a new concern. *J Clin Microbiol* **43**:1072-5. (2005).
- 8) Y. Ishii, A. Ohno, H. Taguchi, S. Imajo, M. Ishiguro, and H. Matsuzawa. Cloning and sequence of the gene encoding a cefotaxime-hydrolyzing class A β -lactamase isolated from *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* **39**:2269-75. (1995).
- 9) S. Kimura, M. Ishiguro, Y. Ishii, J. Alba, and K. Yamaguchi. Role of a mutation at position 167 of CTX-M-19 in ceftazidime hydrolysis. *Antimicrob Agents Chemother* **48**:1454-60. (2004).
- 10) L. Ma, J. Alba, F Y Chang, M. Ishiguro, K. Yamaguchi, L. K. Siu, and Y. Ishii. Novel SHV-derived extended-spectrum β -lactamase, SHV57, that confers resistance to ceftazidime but not cefazolin. *Antimicrob Agents Chemother* **49**:600-5. (2005).
- 11) Y. Nitanaï, T. Shimamura, T. Uchiyama, Y. Ishii, M. Takehira, K. Yutani, H. Matsuzawa, and M. Miyano. The catalytic efficiency k_{cat}/K_m of the class A β -lactamase Toho-1 correlates with the thermal stability of its catalytic intermediate analog. *Biochim Biophys Acta.* (2009).
- 12) T. Shimamura, A. Ibuka, S. Fushinobu, T. Wakagi, M. Ishiguro, Y. Ishii, and H. Matsuzawa. Acyl-intermediate structures of the extended-spectrum class A β -lactamase, Toho-1, in complex with cefotaxime, cephalothin, and benzylpenicillin. *J Biol Chem* **277**:46601-8. (2002).
- 13) T. Takenouchi, Y. Ishii, and K. Yamaguchi. Properties of extended-spectrum β -lactamases constructed by site-directed mutagenesis. *J Infect Chemother* **8**:211-7. (2002).
- 14) 小若順一. シンポジウム 耐性菌問題を考える, 東京, 11月21日. (2003).
- 15) N. H. Khan, Y. Ishii, N. Kimata-Kino, H. Esaki, T. Nishino, M. Nishimura, and K. Kogure. Isolation of *Pseudomonas aeruginosa* from open ocean and comparison with freshwater, clinical, and animal isolates. *Microb Ecol* **53**:173-86. (2007).
- 16) L. Poirel, C. Heritier, and P. Nordmann. Genetic and biochemical characterization of the chromosome-encoded class B β -lactamases from *Shewanella livingstonensis* (SLB-1) and *Shewanella frigidimarina* (SFB-1). *J Antimicrob Chemother* **55**:680-5. (2005).
- 17) J. C. Venter, K. Remington, J. F. Heidelberg, A. L. Halpern, D. Rusch, J. A. Eisen, D. Wu, I. Paulsen, K. E. Nelson, W. Nelson, D. E. Fouts, S. Levy, A. H. Knap, M. W. Lomas, K. Nealson, O. White, J. Peterson, J. Hoffman, R. Parsons, H. Baden-Tillson, C. Pfannkoch, Y. H. Rogers, and H. O. Smith. Environmental genome shotgun sequencing of the Sargasso Sea. *Science* **304**:66-74. (2004).
- 18) A. Kojima, Y. Ishii, K. Ishihara, H. Esaki, T. Asai, C. Oda, Y. Tamura, T. Takahashi, and K. Yamaguchi. Extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* strains isolated from farm animals from 1999 to 2002: report from the Japanese Veterinary Antimicrobial Resistance Monitoring Program. *Antimicrob Agents Chemother* **49**:3533-7. (2005).
- 19) R. E. Warren, V M. Ensor, P O'Neill, V Butler, J. Taylor, K. Nye, M. Harvey, D. M. Livermore, N. Woodford, and P M. Hawkey. Imported chicken meat as a potential source of quinolone-resistant *Escherichia coli* producing extended-spectrum β -lactamases in the UK. *J Antimicrob Chemother* **61**:504-8. (2008).
- 20) H. Hasman, D. Mevius, K. Veldman, I. Olesen, and F M. Aarestrup. β -Lactamases among extended-spectrum β -lactamase (ESBL)-resistant *Salmonella* from poultry, poultry products and human patients in The Netherlands. *J Antimicrob Chemother* **56**:115-21. (2005).
- 21) Y. Matsumoto, H. Kitazume, M. Yamada, Y. Ishiguro, T. Muto, H. Izumiya, and H. Watanabe. CTX-M-14 type β -lactamase producing *Salmonella enterica* serovar enteritidis isolated from imported chicken meat. *Jpn J Infect Dis* **60**:236-8. (2007).
- 22) S. Bertrand, F X. Weill, A. Cloeckaert, M. Vrints, E. Mairiaux, K. Praud, K. Dierick, C. Wildemaue, C. Godard, P Butaye, H. Imberechts, P A. Grimont, and J. M. Collard. Clonal emergence of extended-spectrum β -lactamase (CTX-M-2)-producing *Salmonella enterica* serovar Virchow isolates with reduced susceptibilities to ciprofloxacin among poultry and humans in Belgium and France (2000 to 2003). *J Clin Microbiol* **44**:2897-903. (2006).