

図1 ヒト由来 S. Enteritidis の年次別薬剤別耐性菌出現頻度

表2 食中毒関連食品から分離されたS.Enteritidisの薬剤耐性パターン

分離年	由来	供試菌株数	薬剤耐性パターン
2000年	卵の殻	2	—
	ブロッコリー	1	—
	たらこ	1	—
2001年	寮の食事	1	—
	山かけ	1	SM
	焼き鳥用鶏肉	1	—
2002年	鶏卵の殻	1	—
	液卵(残品)	1	—
	かまぼこ	2	—
	台所の生ゴミ	1	—
2003年	卵の殻	3	—
	未殺菌液卵	1	SM
	生卵白	1	SM
	鶏肉	1	NA
	鶏軟骨	1	NA

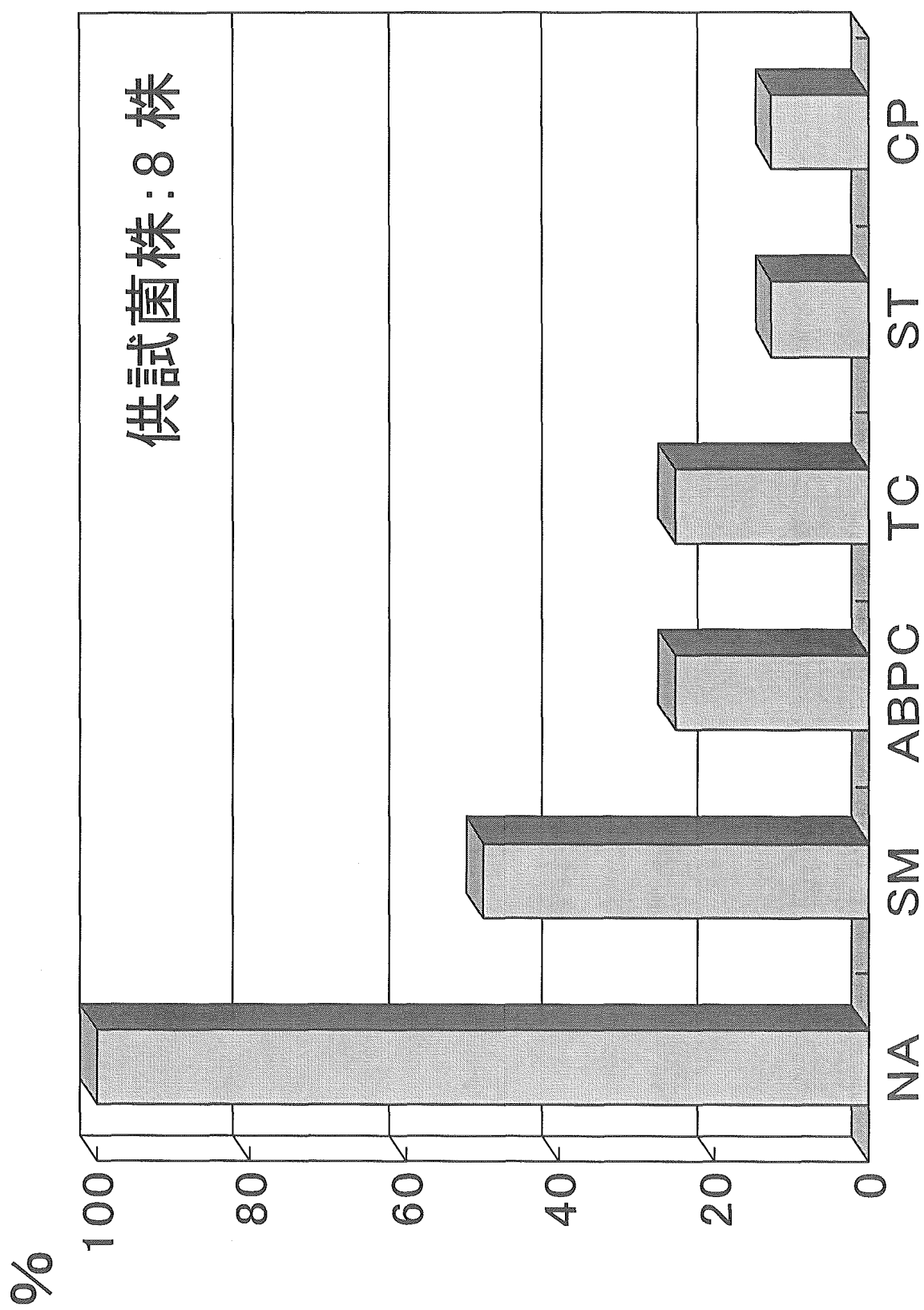


図2. 輸入鶏肉から分離されたS.Enteritidis の薬剤耐性率

表3. NA耐性S.Enteritidisのフルオロキノロン系薬剤に対するMIC分布

薬剤	ヒト由来 (n=16)	食品由来 (n=2)	鶏肉由来 (n=8)
NA	>256	>256	128~>256
CPFEX	0.1 ~0.25	0.125~0.5	0.25~0.5
NFLX	0.5 ~2.0	0.5 ~1.0	0.5 ~1.0
OFLX	0.5 ~1.0	0.5 ~1.0	0.5 ~1.0
LVFX	0.25 ~0.5	0.5	0.25 ~0.5

MIC μ g/mL

CPFEX 耐性: ≥ 2.0 , 低感受性: $0.1 \sim 1.0$, 感受性: < 0.1

表4. 下痢症患者由来ナリジクス酸耐性S.Enteritidis株の
gyrA遺伝子変異

年	菌株数	変異点	
		83 (Ser)	87 (Asp)
1995	3	Phe	—
1999	1	—	Gly
2001	1	Tyr	—
	2	—	Asn
2002	1	—	Asn
2003	1	Tyr	—
	1	—	Asn
	3	—	Tyr
2004	1	—	Asn
	2	—	Tyr

表5. 鶏肉由来ナリジクス酸耐性S.Enteritidis株のgyrA遺伝子変異

由来	菌株数	変異点
		83(Ser) 87(Asp)
食中毒関連食品(鶏肉)	2	Asn
輸入鶏肉	4	Phe
	2	Asn
	1	Tyr
	1	Gly

2003~2004年分離株

表6. 東京都内で発生したサルモネラ血清型Typhimurium DT104による
集団食中毒事例

No.	発生年月	発生場所	喫食者数	患者数	原因食品	薬剤耐性パターン
1	1997. 10	保育園	21	11	保育園給食	CP, TC, SM, ABPC
2	1998. 4	保育園	不明	5	不明	CP, TC, SM, ABPC
3	1998. 5	飲食店	7	6	牛レバ刺し	CP, TC, SM, ABPC, ST, NA
4	1998. 5	飲食店	不明	4	牛レバ刺し	CP, TC, SM, ABPC, ST, NA
5	1999. 5	不明	4	4	不明	CP, TC, SM, ABPC
6	1999. 5	不明	6	4	不明	CP, TC, SM, ABPC, NA
7	2001. 10	不明	2	2	レバ刺し	CP, TC, SM, ABPC
8	2001. 12	飲食店?	44	3	不明	CP, TC, SM, ABPC
9	2002. 10	飲食店	28	9	仕出し弁当	CP, TC, SM, ABPC

No.3およびNo.4: 牛レバ刺し残品から患者と同一菌を検出

No.8: 喫食者44名中13名からカンピロバクター, 3名からサルモネラを検出

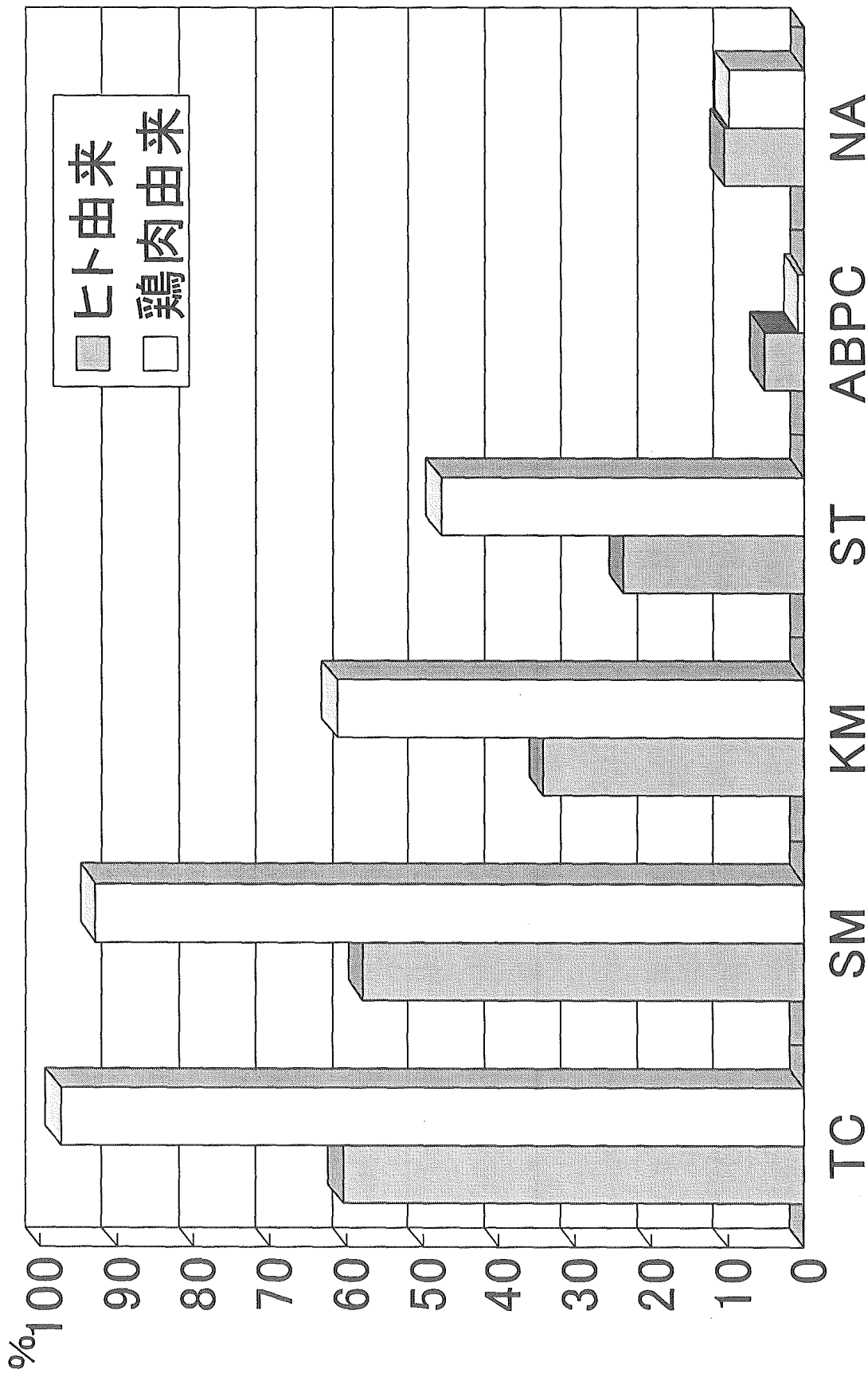


図3 ヒトおよび鶏肉由来 S. Infantis の薬剤別耐性率

供試菌株: ヒト由来 16株 (2000年~2002年)

鶏肉由来 90株 (2002年4月~12月)

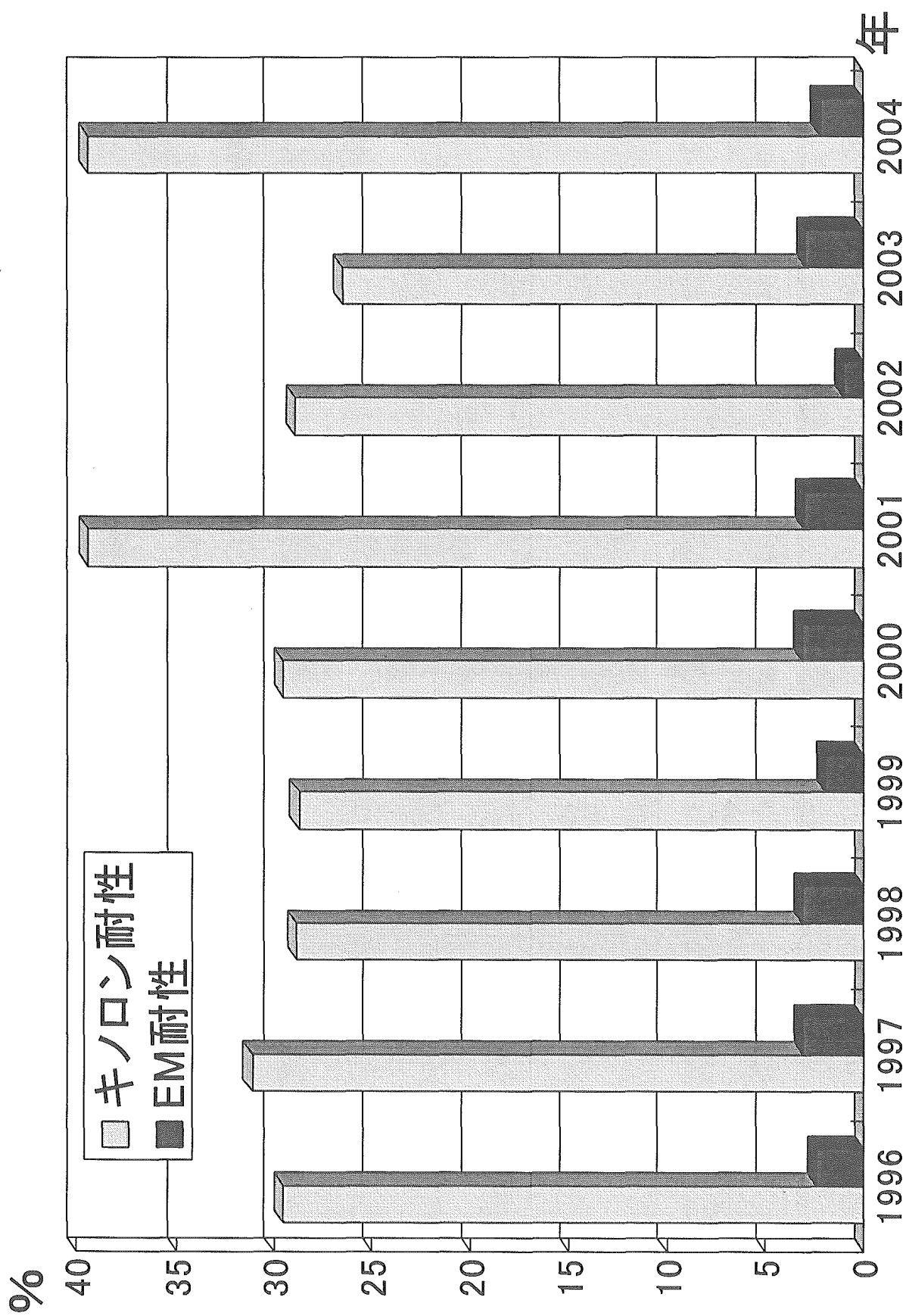


図4 *Campylobacter jejuni*: キノン剤 (NFLX・OFLX・CPFX・NA) およびエリスロマイシン耐性株の出現状況

表8 鶏肉から分離されたカンピロバクターの薬剤感受性試験成績:
 国産(生肉、内臓肉)

	<i>C.jejuni</i>		<i>C.coli</i>	
供試菌株数	235	(%)	29	(%)
感受性	98	(41.7)	5	(17.2)
耐性	137	(58.3)	24	(82.8)
TC	63	(26.8)	12	(41.4)
NFLX OFLX CPFX NA	34	(14.5)	5	(17.2)
NFLX OFLX CPFX NA TC	40	(17.0)	6	(20.7)
NFLX OFLX CPFX NA TC EM	0	(0.0)	1	(3.4)
キノロン耐性株	74	(31.5)	12	(41.4)

供試鶏肉数:210検体

表9 輸入鶏肉から分離された*C.jejuni*の薬剤感受性試験成績

	ブラジル	タイ	中華人民共和国	米国
供試菌株数	11	3	2	1
感受性(%)	3 (27.3)	1 (33.3)	0 (0)	0 (0)
耐性(%)	8 (72.7)	2 (66.7)	2 (100)	1 (100)
TC	4 (36.4)			1 (100)
NFLX OFLX CPFX NA	2 (18.2)	1 (33.3)		
NFLX OFLX CPFX NA TC	2 (18.2)	1 (33.3)	2 (100)	
NFLX OFLX CPFX NA TC EM				
キノロン耐性株(%)	4 (36.4)	2 (66.7)	2 (100)	0 (0)

供試薬剤: NFLX, OFLX, CPFX, NA, TC, EM

表10 輸入鶏肉から分離された*C. coli* の薬剤感受性試験成績

	ブラジル	タイ	中華人民共和国	米国
供試菌株数	5	4	1	0
感受性(%)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	
耐性(%)	5 (100)	4 (100)	1 (100)	
TC				
NFLX OFLX CPFX NA	1 (20.0)	1 (25.0)		
NFLX OFLX CPFX NA TC	4 (80.0)	3 (75.0)		
NFLX OFLX CPFX NA TC EM			1 (100)	
キノロン耐性株(%)	5 (100)	4 (100)	1 (100)	

供試薬剤: NFLX, OFLX, CPFX, NA, TC, EM

表7 散発事例由来 *C.jejuni* のキノロン剤に対する耐性株出現状況(東京都)

耐性パターン	1997年	1998年	1999年	2000年	2001年	2002年	2003年	2004年	計
供試株数	103	132	129	183	170	204	200	193	1314
NFLX									
NA									
CPFX	1								1
OFLX									
TC	NT	NT	28	46	40	39	34	21	208
EM	3	3				2		1	9
EM					1			2	3
NA									
NA									
CPFX									
NFLX									
NFLX									
NFLX	3	1							4
NFLX									
NFLX									
NFLX	2								2
NFLX									
NFLX									
NFLX	25	35	18	30	34	26	36	53	257
NFLX									
OFLX									
NFLX									
NFLX									
NFLX	1	2	18	22	33	33	16	21	143
NFLX									
NFLX			1	2			1	1	5
耐性菌	35(34.0%)	41(31.1%)	65(50.4%)	100(54.6%)	108(63.5%)	100(49.0%)	87(43.5%)	100(51.8%)	636(48.4%)
感受性菌	68(66.0%)	91(68.9%)	64(49.6%)	83(45.4%)	62(36.5%)	104(51.0%)	113(56.5%)	93(48.2%)	678(51.6%)
キノロン耐性菌	32(31.1%)	38(28.8%)	37(28.7%)	54(29.5%)	67(39.4%)	59(28.9%)	53(26.5%)	76(39.4%)	415(31.6%)

厚生労働科学研究費補助金（食品安全確保研究事業）

平成 15～17 年度 総合分担研究報告書

食品由来の食中毒菌による耐性獲得リスクマネージメント手法に関する研究

分担研究者 五十君静信 国立医薬品食品衛生研究所 室長
協力研究者 山本茂貴 国立医薬品食品衛生研究所 部長
協力研究者 岡田由美子 国立医薬品食品衛生研究所 主任研究官
協力研究者 山崎 学 国立医薬品食品衛生研究所
協力研究者 石和 玲子 国立医薬品食品衛生研究所

研究要旨

わが国において、カンピロバクターやサルモネラは、食中毒発生事例が多く、代表的な食中毒起因菌であるが、抗生物質耐性菌が増加傾向にあり、問題となっている。一方、スウェーデン王立研究所の研究により、鶏に用いられたアボパルシンと、バンコマイシン耐性腸球菌の出現に因果関係が示され、耐性菌の出現に食肉動物の飼料に用いられた抗菌物質が関与していることが示唆されている。本分担研究では、主にカンピロバクターに注目して食品分離株における耐性に関わる検討を行うと共に、研究班全体より得られた生産段階、食品、臨床といったそれぞれの分離株に関する耐性に関する情報を基に、耐性菌出現防止に関わるリスクマネージメント手法の検討を目的とした。H15 年度は、食品特に鶏肉におけるカンピロバクターの汚染実態の検討を開始したところ、カンピロバクター分離が検査法により全く異なることから、まず検出手法の研究班内での標準化を開始し、H16 年度にかけて検出法の標準化および定量的な検査法の確立を行った。H17 年度にはこの手法を用いて、全国 9 箇所の地方衛生研究所の協力により、全国規模で市販鶏肉におけるカンピロバクターの汚染実態を定量的に調べると共に、得られた分離株につき抗生物質耐性獲得状況を明らかにした。この結果を食品由来株の耐性獲得の基礎データとし、文献及び分担研究者によって明らかにされたカンピロバクター臨床分離株、環境分離株の耐性獲得状況と比較を試みた。加えて、菌の分布状況がカンピロバクターとは異なり、環境に広く分布し、カンピロバクターのような生産動物における抗菌性物質使用の影響をほとんど受けないと予想されるリステリア分離株に関しても、耐性獲得状況を調べ、カンピロバクターの耐性獲得状況と比較を試みた。食品分離カンピロバクターでは、ニューキノロン系薬剤を中心に 4 薬剤以上耐性株が約 38% 認められた。この耐性状況は、散发下痢症患者から 2004 年に分離されたカンピロバクター株の耐性獲得とほぼ同じ割合であった。一方、環境での分布が広く、耐性獲得が臨床的に用いられる抗生物質が主であると思われるリステリアにおいては、分離株の耐性獲得はほとんど見られなかった。

A. 研究目的

カンピロバクター等の食中毒菌の抗菌剤耐性に関するリスクアセスメントに必要なデータを収集し、耐性菌出現防止に関わるリスクマネジメント手法の基礎となり、耐性菌の出現の防止に有効な対策に関する情報を提供する。

B. 研究方法

食中毒菌特にカンピロバクターを主な対象菌として日本国内における情報およびデータの収集を行うとともに、食品（鶏肉）における定量的な汚染実態と抗生物質耐性獲得状況についてわが国の実態を明らかにする。米国 FDA により行われたリスクアセスメントの情報を参考に、耐性獲得リスクマネジメントに関する検討を試みる。実験としては、

(1) 食品からのカンピロバクター分離手法の標準化：海外の主要なプロトコルを、調べ PHLS 法、FDA-CFSAN (BAM) 法、ISO 法を比較検討し、文献等の情報から、標準的なプロトコル原案を作成した。この案につき、日常的に検査を行っている地方衛生研究所に意見をもとめ、個々の問題点を明らかにすると共に、プロトコルを完成させる上で、実験によるデータの確認が必要と思われる部分を議論し明らかにした。これらの重要な部分については、カンピロバクター分離に実績のある地方衛生研究所 9 機関と共同で、検査法の標準化を行った。

(2) カンピロバクターの鶏肉における定量的な汚染状況掌握には、MPN 3 本法により行った。鶏肉からの分離を試みた機関は、以下の 10 機関である。

国立医薬品食品衛生研究所
東京都健康安全研究センター
埼玉県衛生研究所
秋田県衛生科学研究所
群馬県衛生環境研究所
愛知県衛生研究所
大阪府立公衆衛生研究所
広島市衛生研究所
山口県環境保健研究センター
熊本県保健環境科学研究所

(3) 食中毒菌の耐性獲得状況の基礎データとしては、カンピロバクターについては、市販鶏肉分離株を対象として、ディスク法により耐性獲得を判定した。対象とした薬剤は、NFLX、OFLX、CPFX、NA、TC、EM、CF の 7 剤である。

(4) 耐性獲得が主に臨床的な抗菌剤使用であると考えられる食中毒菌としてはリストeriaを対象とした。食品由来 100 株、臨床由来 101 株について、寒天平板希釈法により MIC を測定した。対象とした薬剤は、ABPC、CTF、DSM、GM、KM、EM、LCM、NHT、VCM、VGM、SNM、OTC、BC、CP、NA、ERFX の 16 剤である。

C. 研究結果

食品からのカンピロバクター分離の標準法を作成にあたって、海外の 3 種の標準法（PHLS 法、BAM 法、ISO 法）の特徴とそれを基に検討したプロトコル原案の概略をまとめた比較表を作成し、これを基にプロトコル原案を作成した。これをたたき台として、食品や臨床材料からのカンピロバクター分離実績のある衛生研究所の研究者の意見を合わせ、検査法の問題点及び検討が必要な重要項目を整理し、その重要

項目を、国立医薬品食品衛生研究所、東京都健康安全研究センター、埼玉県衛生研究所、秋田県衛生科学研究所、群馬県衛生環境研究所、愛知県衛生研究所、大阪府立公衆衛生研究所、広島市衛生研究所、山口県環境保健研究センター、熊本県保健環境科学研究所の10衛生研究所のネットワークを作り、分担して検討し、班として統一した検査法を作成した。検査法の概要は、図1に示す。

この検査法で、市販の鶏肉からのカンピロバクター分離を試み、得られた分離株について耐性獲得状況を調べた。市販鶏肉におけるカンピロバクターの検出率は、冷蔵肉201検体の平均陽性率は72%で、冷凍肉30検体の陽性率は37%であった。MPN3本法で行った市販鶏肉76検体におけるカンピロバクター汚染菌数は、図2に示した。MPN法における市販鶏肉からのカンピロバクターの陽性率は72%で、定性法の冷蔵肉とほぼ同じであった。検出菌数はグラムあたり100個以下が57%で、グラムあたり100個を越える菌数を示したのは、16%であった。

市販鶏肉から分離したカンピロバクター株について、ディスク法によりNFLX、OFLX、CPFX、NA、TC、EM、CFの7剤について、耐性獲得を判定した。市販鶏肉分離株の耐性獲得状況は、表1に示す。表1には、比較のため2004年に、地方衛生研究所が散発下痢症患者から分離したカンピロバクター分離株の耐性獲得状況を示す。下痢症散発事例から分離された株の耐性状況と市販鶏肉の耐性獲得状況は、その傾向は似ていると言える。市販鶏肉では、テトラサイクリン単独耐性株が約15%であり、

散発下痢症分離株では、約11%であった。4剤以上の耐性株は、鶏肉で約38%、散発下痢症分離株で約39%とほぼ等しかった。鶏肉で、NFLX、OFLX、CPFX、NA耐性が28%と高いのに対して、散発下痢症分離株で約19%、この4剤耐性に加えTC耐性の5剤耐性株が、鶏肉で8%であったのに対し、散発下痢症分離株で約19%と高い点がやや異なっていた。

リステリアの環境および食品分離株100株、臨床分離株101株の16薬剤に対するMIC測定値を、表2に示した。調査した16薬剤において、OTCで、臨床由来株の一部の耐性獲得が見られた以外は、耐性獲得と思われる株はほとんど無く、臨床由来株、環境および食品由来株を比較してもあまり大きな耐性獲得の違いは認められなかった。

D. 考察

国内における食品からのカンピロバクター検査法は公定法がこれまでなかった。一方、実際の食品特に食中毒で問題となる鶏肉について、市販食品から分離を試みるとその検査法により分離状況が異なることが知られている。同一の鶏肉の汚染を定性的に調べた場合においても検査法によりその汚染率は、2倍近く異なることがある。耐性獲得リスクを考える場合、検査法の統一は必須であり、鶏肉における耐性菌のプールを正確に求めるためには、可能な限り定量的な汚染実態を掌握する必要がある。班として食品からの分離方法を検討し、統一し、その方法を用いて食品からのカンピロバクター分離を行い、その分離株の耐性状況を明らかにすることにした。そこで、海外で標準法として用いられている英国の

PHLS 法、米国 FDA の BAM 法、そして ISO 法について詳しく検討を行い、標準法原案を作成した。このプロトコールにつき、臨床や食品からのカンピロバクター分離の実績のある衛生研究所に意見を求め、実施にあたって特に重要となる点、実験的にデータを出して検討が必要と思われる点を明らかにした。この検討を要する重要ないくつかのポイントについては、国立医薬品食品衛生研究所に加え、9 の地方衛生研究所のネットワークを作り、検討を加えた。その結果として、図 1 に概要を示した検査法にほぼ統一した。

統一した検査法を用い、市販鶏肉分離株の耐性状況を明らかにした。市販鶏肉の冷蔵品では、72%、冷凍品では 37%が、カンピロバクターに汚染されている。この汚染率は国内の市販鶏肉の一般的な値と見なすことが出来る。冷凍品からの分離率が低いのは、カンピロバクターが凍結に弱い菌であり、凍結融解により多くの菌が死滅したことによると思われる。むしろ、凍結鶏肉から 4 割近い割合でカンピロバクターが分離されたのは予想以上の汚染率であった。

市販鶏肉では、調べた 7 薬剤の内 4 剤以上の耐性株が約 38%みられ、この傾向は、散発性下痢症分離株の耐性獲得状況とほぼ同じであった。ニューキノロン系の薬剤を中心として、カンピロバクターの耐性率が高いことが確認された。臨床分離株と、市販鶏肉分離株でほぼ同様な割合で、耐性株が認められたことは、鶏肉を汚染しているカンピロバクターの耐性獲得は、急性のカンピロバクター胃腸炎の原因となるカンピロバクター耐性に直接的に影響を与えていると言える。ただ、多剤耐性のパターンが、

市販鶏肉由来株と、臨床由来株でやや異なったパターンであったことは興味深い。即ち、臨床分離株では、NFLX、OFLX、CPFX、NA の 4 剤耐性株と、これに TC を加えた 5 剤耐性株がほぼ同数分離されているが、鶏肉分離株では、同様な 5 剤耐性株は、4 剤耐性株よりかなり少なく、3 分の 1 以下であった。

リステリアの臨床分離株と食品および環境分離株につき、16 薬剤を対象に MIC の測定を行った。リステリアは、腸球菌やカンピロバクターのような生産動物への抗菌剤の使用がその耐性獲得に直接影響を受けると考えられている細菌と異なり、自然界に広く分布し、このような選択圧を受けにくいと思われる。すなわち、リステリアの耐性獲得は、腸球菌やカンピロバクターと異なり、主に医療現場での耐性獲得が主であると考えられる。リステリアは、グラム陽性菌である事から、同じグラム陽性菌である腸球菌で耐性獲得を検討する抗生物質を中心に 16 剤を選び耐性状況を明らかにした。

E. 結論

食品（鶏肉）からのカンピロバクター分離の検査法を作成し、班としての統一した検査法を用い、市販鶏肉分離株の耐性状況を明らかにした。市販鶏肉の冷蔵品では、72%、冷凍品では 37%が、カンピロバクターに汚染されている。市販鶏肉では、調べた 7 薬剤の内 4 剤以上の耐性株が約 38%みられ、この傾向は、散発性下痢症分離株の耐性獲得状況とほぼ同じであった。一方、耐性獲得が主に臨床で使用する抗菌剤であると思われるリステリア分離株では、16 薬

剤の耐性獲得はほとんど見られなかった。

F. 健康危機情報
なし

G. 研究発表
(英文発表)

Fukuyasu T, Igimi S, Uchida K, Eguchi M,
Endo T, Ooshima K, Kuwano A, Sawada

T and Tamura Y: Standards of the in vitro mutation frequency study and the antimicrobial activity study in gut. *The Journal of Antibiotics*. 56: 191-196, (2003)
(和文発表)

澤田拓士、五十君静信、浅井鉄夫。国内に分布する抗菌剤耐性菌のコントロールに向けて。獣医畜産新報。58:674-676. (2005)

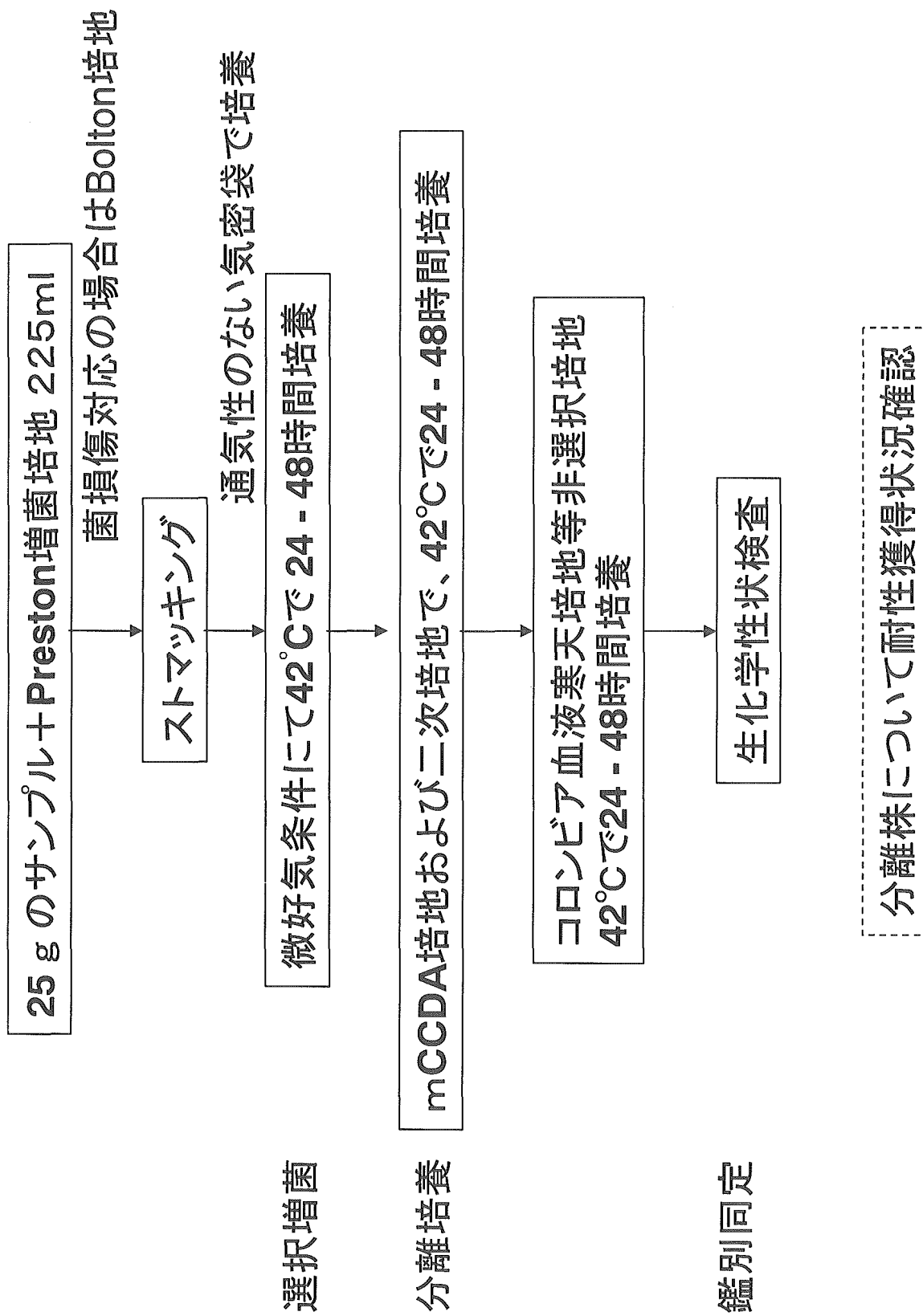


図1. 食品からのカンピロバクター検出法概要

図2. 市販鶏肉のカンピロバクター汚染菌数(n=76)

