

ピロバクターは46検体中16検体(34.8%)から16株が分離された。フルオロキノロン耐性株はカンピロバクターで4株分離された。

A. 研究目的

近年、ヒトに関係する感染症細菌の中でも最も身近な存在である食中毒細菌において、従来有効であった治療薬剤に抵抗を示す耐性菌の出現や増加が問題となっている。特にヒトの治療上重要であるフルオロキノロン剤やセフェム系薬剤に抵抗を示す菌株の出現は、直接ヒトの治療に大きく影響するため、その耐性化の動向を監視することが急務である。そこで、耐性化の動向を把握するため、食品・ヒト由来食中毒細菌、特にサルモネラ及び腸管出血性大腸菌などを対象に、血清型別や薬剤感受性等の性状解析を行う。

B. 研究方法

I. 供試菌株

1. ヒト由来

埼玉県内で分離された散発下痢症例、集団食中毒事例及び健康保菌者由来のサルモネラ・腸管出血性大腸菌・カンピロバクター・赤痢菌を医療機関等の協力を得て広く収集した。

2. 食品由来

買い取りによる検体収集を行い、サルモネラ・腸管出血性大腸菌・カンピロバクター・MRSAの分離を検討し、調査に供した。

3) 食鳥処理場由来

食鳥処理場でのと体フキトリからのサルモネラ・カンピロバクターの分離を検討し、調査に供した。

4) 動物由来

従来行ってきた伴侶動物のイヌやネコに加え、「埼玉県アライグマ防除実施計画」に基づき捕獲された野性化アライグマのサルモネラ分離を検討し、調査に供した。

II. 薬剤感受性試験

収集した菌株は米国臨床検査標準化協会(CLSI)の抗菌薬ディスク感受性試験実施基準に基づき、市販の感受性試験用ディスク(センシディスク:BBL)を用いて行った。サルモネラ、腸管出血性大腸菌、赤痢菌はクロラムフェニコール(CP;30 μ g)、ストレプトマイシン(SM;10 μ g)、テトラサイクリン(TC;30 μ g)、カナマイシン(KM;30 μ g)、アミノベンジルペニシリン(ABPC;10 μ g)、ナリジクス酸(NA;30 μ g)、セフトキシム(CTX;30 μ g)、シプロフロキサシン(CPFX;5 μ g)、ゲンタマイシン(GM;10 μ g)、ホスホマイシン(FOM;50 μ g)、ノルフロキサシン(NFLX;5 μ g)、スルファメトキサゾール・トリメトプリム合剤(ST;25 μ g)の12薬剤で、ヒト由来株についてはイミペネム(IMP;10 μ g)、アミカシン(AMK;30 μ g)、メロペネム(MEPM;10 μ g)、スルフィソキサゾール(Su;250 μ g)の4薬剤を加えた16薬剤を供試した。カンピロバクターはテトラサイクリン(TC;30 μ g)、ナリジクス酸(NA;30 μ g)、シプロフロキサシン(CPFX;5 μ g)、ノルフロキサシン(NFLX;5 μ g)、オフロキサシ

ン (OFLX:5 μ g) 、 エリスロマイシン (EM:15 μ g) の 6 薬剤を供試した。

C. 研究結果

(1) ヒト由来サルモネラ

埼玉県内で 2010 年に、散発下痢症患者及び食品従事者の検便などにおいて健康者から分離されたサルモネラの血清型別分離状況を表 1 に示した。分離された 137 株は 39 血清型に型別され、最も多く分離されたのは、*S. Enteritidis* が 40 株、次いで *S. Thompson* が 9 株、*S. Infantis* と *S. Braenderup* が 7 株の順であった。

この 137 株について薬剤感受性試験を実施した結果、供試した 137 株のうち 50 株 (36.5%) が 16 薬剤のいずれかに耐性を示した。最も多く分離された *S. Enteritidis* では 40 株のうち 26 株 (65.0%) が耐性を示し、SM 単剤耐性が 18 株と最も多かった。

分離株の区分別耐性パターンを表 2 に示す。最も多かったのは SM 耐性で 18 株が該当し、次いで NA 耐性が 7 株分離された。また 4 剤以上の薬剤に耐性を示す多剤耐性株が 10 株分離され、そのうち第 3 世代セフェム系薬剤である CTX に対する耐性菌が 3 株分離された (表 3)。No. 1 は、入院中に下痢が有り、その検査において分離された株であった。血清型は *S. Enteritidis* で、そのファージ型は 3 であった。薬剤感受性では CTX 以外に 7 薬剤に耐性を示す多剤耐性菌であった。No. 2 も胆石での入院中に下痢発熱があった患者から分離された株で、その血清型は *S. Heidelberg* であった。こ

の株も CTX 以外に 7 薬剤に耐性を示す多剤耐性菌であった。No. 3 は下痢、発熱、等の症状を呈した外来患者から分離された株で、その血清型は 04 UT (04:i:-) であった。

(2) 動物由来サルモネラ

動物由来は、伴侶動物のイヌおよびネコに加えて、野生化アライグマのサルモネラ保菌状況調査を行った (表 4)。イヌおよびネコは動物指導センターの協力を得てイヌ 121 頭、ネコ 57 頭の便を材料として実施したが、イヌおよびネコのいずれからも分離されなかった。また、捕獲された野生化アライグマでは 288 頭中 5 頭 (1.7%) の便からサルモネラが分離された。その血清型は *S. Agona* が 1 株、*S. Nagoya* が 4 株であった。薬剤感受性では 5 株とも供試薬剤に対して感受性であった。

(3) 腸管出血性大腸菌

埼玉県内で 2010 年に、散発下痢症患者及び食品従事者の検便検査などにおいて健康者から分離された腸管出血性大腸菌の血清型別分離状況を表 5 に示した。分離された 110 株で最も多く分離された血清型は、0157:H7 (VT1&2 産生) が 55 株、次いで 0157:H7 (VT2 産生) が 21 株、0121:H19 (VT2 産生) が 10 株の順であった。分離 110 株の薬剤感受性試験の結果、供試した 16 薬剤のいずれかに耐性であったのは 29 株 (26.4%) であった (表 6)。耐性株の耐性パターンは 11 パターンに分かれた。最も多かったのは SM・TC・ABPC・Su 耐性で 8 株が該当し、次いで TC 耐性と SM・TC・Su 耐性がそれぞれ 4 株ずつ分離された。

(4) 赤痢菌

2010年に埼玉県内で分離された赤痢菌からフルオロキノロン剤耐性株が1株分離され、その血清型は*S. sonnei*であった(表7)。患者はインドへの渡航歴があり、現地での感染が疑われた。この株のキノロン耐性決定領域(Quinolone Resistance Determining region:QRDR)におけるアミノ酸変異を調べた結果、*gyrA*で2つのコドン(83位のセリン、87位のアスパラギン酸)、*parC*で1つのコドン(80位のセリン)の変異が確認された。

(5) 食品からの分離

2010年7月から11月にかけて、埼玉県内の市場等で食肉、食鳥肉、内臓肉及び漬物、計76検体を購入し、腸管出血性大腸菌、サルモネラ、カンピロバクター、MRSAの検査を行った。なお、カンピロバクターについては牛レバー15検体及び食鳥肉10検体のみを対象とした(表8)。

その結果、サルモネラは鶏挽肉(国産及び輸入)7検体から検出された。カンピロバクターは牛レバー2検体、鶏挽肉(国産及び輸入)8検体から検出された。腸管出血性大腸菌はいずれの検体からも検出されなかった。MRSAは、食肉76検体中12検体から検出された黄色ブドウ球菌29株について、クロモアガーMRSA培地での発育及び*mecA*遺伝子の保有を検討した結果、すべて該当しなかった。鶏挽肉5検体はサルモネラとカンピロバクターの両菌種が検出された。

検出されたサルモネラの血清型及び薬剤感受性は、*S. Schwarzengrund*がSM・TC・KM耐性、*S. Manhattan*がNA耐性、*S. Infantis*はTC耐性、SM・TC・SXT耐性、SM・TC・KM・SXT耐性がそれぞれ1株ずつ、TC・KM・SXT耐性が2株であった(表9)。

分離されたカンピロバクターはすべて*C. jejuni*であり、その薬剤感受性は、牛レバー(2検体)由来株がTC耐性、鶏挽肉(1検体)由来株がNFLX・OFLX、CPFEX・NA・TCであった。残りの鶏挽肉(1検体)由来株は供試薬剤(NFLX、OFLX、CPFEX、NA、TC、EM)すべてに感受性であった(表10)。

(6) 食鳥処理場由来

2010年に埼玉県内の食鳥処理場でのと体フキトリからサルモネラ・カンピロバクターの分離を検討した。

46検体を供試し、サルモネラが1検体から、カンピロバクターが16検体から分離された。サルモネラは*S. Albany*が分離されたが、供試薬剤すべてに感受性であった。カンピロバクターは16株すべてが*C. jejuni*で、TC耐性が10株、NFLX・OFLX、CPFEX・NA耐性が4株、残り2株は感受性であった(表11)。

D. 考察

2010年に県内で分離されたヒト由来サルモネラ137株で供試した16薬剤のいずれかに対して耐性を示したのは50株(36.5%)であり、昨年よりも耐性率が上昇していた。昨年分離されなかったCTX耐性株が3株分離された。血清型は異なるものの、いずれも供試した16薬剤中8

薬剤に耐性を示す多剤耐性株であったことから、継続してその動向を注視する必要があると思われた。

動物由来では、伴侶動物としてのイヌやネコからのサルモネラ分離はなかったが、近年、話題となっている野生化アライグマ5検体から分離された。幸いなことに、分離された5株は供試薬剤すべてに感受性であった。ヒトの生活圏を浸食する野生化アライグマについては、ヒト動物共通感染症の観点からも、今後も監視していかなければならない。

腸管出血性大腸菌は、分離された110株で供試した16薬剤のいずれかに耐性を示したのは29株(26.4%)であった。血清型0157:H7の供試薬剤に対する耐性率は2003~2005年が13.8%、2006~2008年が17.1%、2009~2010年が19.3%と徐々に上昇している。血清型0157:H7は小児や高齢者で特に深刻な症状を示すため、その薬剤感受性の動向には十分注意する必要がある。

赤痢菌ではフルオロキノロン剤耐性株が分離された。この株が分離された患者はインドへの渡航歴があったが、この地域の帰国者からフルオロキノロン剤耐性株の分離は昨年もあったことから、更なる情報収集の強化を図る必要がある。

食品の汚染実態調査において、分離株の薬剤感受性では、供試12薬剤のいずれかに耐性を示す株が、サルモネラは8株すべてが、カンピロバクターは10株中3

株であった。カンピロバクターではフルオロキノロン耐性株が分離されており、食鳥肉のフキトリ調査においても8株中1株がフルオロキノロン耐性であったことから、今後もこれらの動向に注意する必要がある。腸管出血性大腸菌やMRSAは分離されなかったが、いずれも調査を継続する必要があると思われた。

E. 結論

ヒトや食品から分離される食中毒菌の抗生物質に対する耐性率の低下は見られておらず、臨床で使用される頻度の高いフルオロキノロン系薬剤やセフェム系薬剤に対する耐性株も見られたことから、今後とも耐性菌の動向調査を継続していくことが重要である。

F. 健康危機情報

サルモネラにおいて、CTX耐性菌が3株分離されたが、血清型や耐性遺伝子がいずれも異なっていたことから、これらの発生動向等を注視する必要がある。

G. 研究発表

準備中

H. 知的所有権の取得状況

なし

表 1 ヒトから分離されたサルモネラの血清型（2010）

O血清型	血清型名	国内		計
		有症者	無症者	
O4	S.Paratyphi B	2		2
	S.Stanley		1(1)	1(1)
	S.Schwarzengrund	1(1)		1(1)
	S.Saintpaul	1(1)	1(1)	2(2)
	S.Derby		1(1)	1(1)
	S.Agona	2(1)	4(1)	6(2)
	S.Typhimurium	4(4)		4(4)
	S.Heidelberg	1(1)		1(1)
	O4UT	4(1)	2(1)	6(2)
O7	S.Brazzaville	1		1
	S.Choleraesuis	1(1)		1(1)
	S.Livingstone	1		1
	S.Braenderup	1	1	2
	S.Montevideo	3	4	7
	S.Oranienburg	1		1
	S.Thompson	6	3(1)	9(1)
	S.Potsdam	2	1	3
	S.Virchow	2	1	3
	S.Infantis	3(1)	4(1)	7(2)
	S.Bareilly	3	1	4
	S.Mbandaka		2(1)	2(1)
O8	S.Narashino	1	1	2
	S.Nagoya	5		5
	S.Manhattan	2(2)		2(2)
	S.Newport	2(1)	1	3(1)
	S.Kottbus	1		1
	S.Blockley	1		1
	S.Litchfield	2	2	4
	S.Corvallis	2		2
	S.Albany	1(1)		1(1)
O8UT	1		1	
O9	S.Enteritidis	33(23)	7(3)	40(26)
	S.Panama	2		2
	S.Miyazaki	1		1
O3,10	S.Weltevreden	3		3
O1,3,19	S.Senftenberg		1	1
	O1,3,19UT	1(1)		1(1)
O13	S.Havana		1	1
O16	O16UT		1	1
計		97(39)	40(11)	137(50)

() : 薬剤耐性株数

表2 ヒトから分離されたサルモネラの薬剤耐性パターン(2010)

	国内		計
	有症者	無症者	
供試菌株数	97	40	137
耐性株数 (%)	39 40.2%	11 27.5%	50 36.5%
薬剤耐性パターン			
SM	15	3	18
TC	2	3	5
ABPC	1		1
KM		1	1
NA	5	2	7
KM・ABPC	1		1
TC・NA	1		1
CP・SM・Su	2		2
SM・TC・Su	3	1	4
CP・TC・SXT・Su		1	1
SM・TC・KM・Su	1		1
SM・TC・ABPC・Su	1		1
SM・TC・ABPC・NA・Su	1		1
SM・TC・ABPC・SXT・Su	1		1
SM・TC・KM・ABPC・NA・Su	1		1
CP・SM・ABPC・NA・CTX・SXT・Su	1		1
CP・SM・TC・ABPC・NA・SXT・Su	1		1
CP・SM・TC・ABPC・CTX・GM・SXT・Su	1		1
SM・TC・KM・ABPC・NA・CTX・GM・Su	1		1
計	39	11	50

CP：クロラムフェニコール，SM：ストレプトマイシン，TC：テトラサイクリン，KM：カナマイシン
 ABPC：アンピシリン，NA：ナリジクス酸，CTX：セフトキシム，CPFX：シプロフロキサシン
 GM：ゲンタマイシン，FOM：ホスホマイシン，NFLX：ノルフロキサシン，SXT：ST合剤
 IMP：イミペネム，AMK：アミカシン，MEPM：メロペネム，Su：スルフィソキサゾール

表 3 ヒト由来CTX耐性サルモネラの血清型・耐性遺伝子

No.	血清型	耐性パターン	耐性遺伝子
1	<i>S. Enteritidis</i>	CP・SM・ABPC・NA・CTX・ GM・SXT・Su	CTX-M-9
2	<i>S. Heidelberg</i>	SM・TC・KM・ABPC・NA・ CTX・GM・Su	CTX-M-2
3	O4 UT*	CP・SM・TC・ABPC・CTX・ GM・SXT・Su	CTX-M-15(like) TEM-1

*: O4:i-

表4 イヌ、ネコおよびアライグマからのサルモネラ分離状況(2010)

由来動物	検査数	検出数(陽性率)	血清型名	検出数	薬剤耐性
イヌ	121	0(0%)		0	
ネコ	57	0(0%)		0	
アライグマ	288	5(1.7%)	S.Agona	1	感受性
			S.Nagoya	4	感受性

表5 ヒト由来腸管出血性大腸菌の血清型と毒素型(2010)

血清型	毒素型	検出数	血清型	毒素型	検出数
O157:H7	VT1&2	55	O91:HUT	VT1	2
O157:H7	VT2	21	O110:H7	VT2	1
O157:H7	VT1	1	O121:H19	VT2	10
O157:H-	VT1&2	7	O145:H-	VT2	1
O26:H11	VT1&2	1	O146:H21	VT1	1
O26:H11	VT1	7	O165:H-	VT2	1
O74:H12	VT2	1	合計		110
O91:H-	VT1	1			

表6 ヒト由来腸管出血性大腸菌の薬剤耐性パターン(2010)

	0157:H7	0157:H-	026:H11	091:HUT	091:H-	0145:H-	0165:H-	その他*	計
供試菌株数	77	7	8	2	1	1	1	13	110
耐性株数	17	3	4	2	1	1	1	0	29
(%)	22.1%	42.9%	50.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	0.0%	26.4%
薬剤耐性パターン									
CP	1								1
SM	1								1
TC	2		2						4
SM・TC							1		1
SM・Su		1	1						2
CP・SM・ABPC	1								1
SM・TC・Su	2			2					4
SM・TC・ABPC	1								1
CP・SM・TC・Su		2							2
SM・TC・ABPC・Su	8								8
SM・TC・NA・Su	1								1
SM・TC・KM・ABPC			1						1
CP・SM・TC・SXT・Su					1				1
SM・TC・ABPC・SXT・Su						1			1

*074:H12(1),0110:H7(1),0121:H19(10),0146:H21(1)

CP:クロラムフェニコール, SM:ストレプトマイシン, TC:テトラサイクリン, KM:カナマイシン,
 ABPC:アミノペンシルペニシリン, NA:ナリジクス酸, CTX:セフトキシム, OPFX:シプロフロキサシン,
 GM:ゲンタマイシン, FOM:ホスホマイシン, NFLX:ノルフロキサシン, SXT:ST合剤
 IMP:イミペネム, AMK:アミカシン, MEPM:メロペネム, Su:スルフィンキサゾール

表7 ヒト由来フルオロキノロン耐性赤痢菌分離例 (2010)

No.	血清型	年齢区分	菌分離月	耐性パターン	海外渡航歴
1	<i>S.sonnei</i>	50代	2010年8月	SM・TC・NA・CPFX・NFLX・SXT	インド

表8 食品からの食中毒菌分離状況(2010)

検体の種類	検体数	陽性検体数			
		STEC	サルモネラ	カンピロバクター	MRSA
牛レバー	15			2	
鶏挽肉	10		7*	8	
豚挽肉	16				
牛豚挽肉	8				
牛挽肉	12				
一夜漬け	15				
計	76	0	7	10	0

*: 1検体から2種類の血清型を分離

表9 食肉から分離されたサルモネラの血清型と耐性パターン(2010)

検体の種類	耐性パターン	血清型名		
		<i>S.Schwarzengrund</i>	<i>S.Infantis</i>	<i>S.Manhattan</i>
鶏挽肉	TC		1	
	NA			2
	TC, SXT		1	
	SM, TC, KM	1		
	TC, KM, SXT		2	
	SM, TC, KM, SXT		1	

表10 食肉からのカンピロバクター分離状況(2010)

検体の種類	検体数	陽性検体数	陽性株数	薬剤感受性パターン(株数)
牛レバー	15	2	2	TC(2)
鶏挽肉	10	8	8	CPFX・OFLX・NFLX・NA・TC(1) 感受性(7)

分離されたカンピロバクターはすべて*C.jejuni*

表11 食鳥肉フキトリ検体からのサルモネラ・カンピロバクター分離状況(2010)

区分	検体数	陽性検体数	陽性株数	薬剤感受性パターン(株数)
サルモネラ	46	1	1	感受性(1)
カンピロバクター	46	16	16	TC(10) CPFX・OFLX・NFLX・NA(4) 感受性(2)

分離されたサルモネラは*S.Albany*

分離されたカンピロバクターはすべて*C.jejuni*

平成 22 年度厚生労働省 食品の安心・安全確保推進研究事業
「薬剤耐性食中毒菌に係る解析技術の開発及び
サーベイランスシステムの高度化に関する研究

分担研究報告書

分担課題名 ヒト由来腸内細菌の薬剤耐性の疫学的研究

研究分担者	甲斐 明美	東京都健康安全研究センター・微生物部
研究協力者	小西 典子	東京都健康安全研究センター・微生物部
	下島優香子	東京都健康安全研究センター・微生物部
	横山 敬子	東京都健康安全研究センター・微生物部
	仲真 晶子	東京都健康安全研究センター・微生物部

研究要旨：ヒトおよび食品から分離されたメチシリン耐性黄色ブドウ球菌（MRSA）、ESBL 産生大腸菌および NDM-1 産生菌の出現状況，そしてカンピロバクターやサルモネラ血清型 Manhattan を対象に薬剤耐性菌出現状況を調べた。食品の MRSA 汚染率は 0.13%，ヒト糞便中の保菌率は 0.35%であった。食肉の ESBL 産生大腸菌汚染率は，国産鶏肉が最も高く 42.9%，輸入鶏肉は 36.8%，国産牛内臓肉は 16.7%であった。下痢症患者由来 *C. jejuni* のキノロン剤耐性率は 33.3%，*C. coli* の耐性率は 77.8%であり *C. jejuni* より耐性率が高かった。EM 耐性 *C. coli* が，近年増加傾向である。サルモネラ血清型 Manhattan の分離数が 2009 年以降増加傾向である。分離株の耐性率は高く，今回実施した 9 株は全て 2 薬剤以上に耐性を示す多剤耐性菌であった。また，CTX 耐性の ESBL 産生菌も検出された。今後も耐性菌出現状況に注意が必要である。

A. 研究目的

近年，医療の現場では第 3 世代セフェム系薬剤に耐性を示す基質特異性拡張型 β ラクタマーゼ（ESBL）産生菌やフルオロキノロン耐性菌が問題となっている。また 2009 年には多剤耐性菌治療の切り札とされているカルバペネム系薬剤に耐性を示す新しいタイプのニューデリ・メタロ β ラクタマーゼ-1（NDM-1）産生多剤耐性菌が確認され，その拡大が懸念されている。

このような状況下，食中毒起因菌を中心とした腸管系病原菌の耐性菌出現状況を把握することは，治療を行う際の資料となるだけでなく，耐性菌出現のメカニズムを解明するためにも重要である。

そこで本研究では，ヒトおよび食品から分離されたメチシリン耐性黄色ブドウ球菌（MRSA），ESBL 産生大腸菌および NDM-1 産生菌の出現状況，そしてカンピロバクターやサルモネラ血清型 Manhattan

を対象に薬剤耐性菌出現状況を調べた。

B. 研究方法

1. MRSA の検出および性状

1) 黄色ブドウ球菌の検出

2007 年 12 月～2010 年 5 月に食中毒の原因追及調査のために搬入された食品（残品，検食，参考品）5,435 検体および 2008 年 5 月～2010 年 5 月に当センターに搬入された糞便 7,443 検体を対象として黄色ブドウ球菌の分離を行った。

2) 薬剤感受性試験

分離された黄色ブドウ球菌についてオキサシリンを用いた薬剤感受性試験（KB 法）および MRSA スクリーン培地（BBL）上での発育試験を行った。オキサシリン耐性および MRSA スクリーン培地上に発育が認められた株を MRSA と判定した。

分離された MRSA については，耐性遺伝

子である *mecA* の保有を PCR 法で確認した。

3) MRSA のエンテロトキシンおよび TSST-1 産生性試験

分離された MRSA のエンテロトキシン (SE) および TSST-1 (T) 産生性試験は RPLA 法 (デンカ生研) で実施した。

2. ESBL 産生大腸菌の検出

1) 食品からの大腸菌の検出

2010 年 5 月～7 月に都内で流通する食品 (牛肉, 牛内臓肉, 豚肉, 鶏肉) 92 検体を対象とした。食肉 25 g に 225 ml のペプトン加生食を加え 10 倍乳剤としたものを, 2 倍濃度のダーラム管入り EC 培地 3 本に各 10 ml ずつ接種後, 44.5°C, 24 時間培養した。培養後, ガス産生が認められた試験管から ESBL 分離用平板 (1 μg/ml CTX 加マッコンキー寒天) に塗抹, 分離した。平板上で発育が認められた集落については LB ブイヨンへ接種しガス産生性が認められた菌を大腸菌と同定した。

2) 薬剤感受性試験

アモキシシリン-クラバン酸とセフトロキジム, セフトラジジム, セフトリアキソン, アズトレオナム, セフトキシム (Su) の各薬剤との間に阻止円の増強が認められた株を ESBL と判定した。

3) ESBL 産生大腸菌の遺伝子型別試験

ESBL 遺伝子型別試験は, TEM, SHV, CTX-M1 グループ, CTX-M-2 グループ, CTX-M-8 グループ, CTX-M-9 グループを検出する PCR 法で行った。

3. NDM-1 産生菌

1) 供試菌株

2009 年に分離された大腸菌 522 株および 2010 年に分離されたサルモネラ 97 株, 腸管出血性大腸菌 69 株, 大腸菌 431 株を供試した。

2) 薬剤感受性試験

研究班共通の薬剤として CPMX, AMK (アミカシン), IPM (イミペネム), MEPM (メロペネム) を選定し, KB 法でスクリーニング試験を実施した。

4. カンピロバクター

1) 供試菌株

2009 年に東京都内で分離された散発下痢症由来 *C. jejuni* 156 株および *C. coli* 9 株を供試した。

2) 薬剤感受性試験

シプロフロキサシン (CPFX), ノルフロキサシン (NFLX), オフロキサシン (OFLX), ナリジクス酸 (NA), テトラサイクリン (TC), エリスロマイシン (EM) の 6 薬剤を供試した。

5. サルモネラ血清型 Manhattan

1) 供試菌株

2010 年に下痢症患者等から分離された 4 株, および食中毒原因菌調査のために搬入された食品から分離された 6 株を供試した。

2) 薬剤感受性試験

アンピシリン (ABPC), セフトキシム (CTX), ゲンタマイシン (GM), カナマイシン (KM), ストレプトマイシン (SM), テトラサイクリン (TC), クロラムフェニコール (CP), ST 合剤 (SXT), ナリジクス酸 (NA), シプロフロキサシン (CPFX), オフロキサシン (OFLX), ホスホマイシン (FOM), ノルフロキサシン (NFLX), スルfoisキサゾール (Su) の 14 薬剤を供試し, 米国臨床検査標準化委員会 (CLSI) 法に従いセンシディスク (BD) を用いた KB 法で行った。

C. 研究結果

1. MRSA

食品 5,435 検体中黄色ブドウ球菌が検出されたのは 774 検体 (14.2%) で, そのうち MRSA は 7 株 (0.13%) であった。MRSA が検出された食品は, 鶏肉, 豚肉, 牛内臓肉, 車えび, アナゴ, 焼鮭, 酢の物であり, 鶏肉と豚肉, 車えび, アナゴおよび酢の物はそれぞれ同一店から収去したものであった。

一方, 糞便検体では 7,443 検体中 931 検体 (12.5%) から黄色ブドウ球菌が検出され, このうち MRSA は 26 株 (0.35%) であった (表 1)。MRSA のエンテロトキシンおよび TSST-1 産生性をみると, 食品由来株では

SEC+T および T のみが各 3 株 (43%), SEA+SEB が 1 株であった。一方、糞便由来株は SEC+T が最も多く 11 株 (41%), 次いで T のみおよび SEB のみが 2 株 (8%), SEA+SEB, SEA, SEC, SED が各 1 株であった (図 1)。

2. ESBL 産生大腸菌

ESBL 産生大腸菌検出状況を表 2 に示した。国産鶏肉からの分離が最も多く 28 検体中 12 検体 (42.9%) から検出された。次いで輸入鶏肉 19 検体中 7 検体 (36.8%), 国産牛内臓肉 18 検体中 3 検体 (16.7%) であった。豚肉から ESBL 産生菌は検出されなかった。

分離された ESBL 産生大腸菌について遺伝子型別試験を実施した結果、国産鶏肉由来では CTX-M-9 グループ, CTX-M-1 グループの順に多かった。輸入鶏肉 (ブラジル産) では CTX-M-2 グループが最も多く、次いで CTX-M-8 グループ, SHV 型の順であった。

3. NDM-1 産生菌

2009 年 9 月, 新しいタイプの耐性菌である NDM-1 産生菌が検出されたという報告を受け, 研究班内で共通の NDM-1 産生菌スクリーニング用薬剤 (CPFX, AMK, IPM, MEPM) を選び, 分離菌株についてスクリーニング試験を実施した。今回は 2009 年に分離された大腸菌, および 2010 年分離の大腸菌, サルモネラおよび腸管出血性大腸菌の合計 1,119 株についてスクリーニング試験を実施した結果, NDM-1 産生菌を疑う菌は検出されなかった。

4. カンピロバクター

ヒト由来 *C. jejuni* および *C. coli* のニューキノロン剤に対する耐性率の推移を図 2 に示した。2009 年分離株の耐性率は *C. jejuni* で 33.3% (156 株中 52 株), *C. coli* では 77.8% (9 株中 7 株) あり, 過去 9 年間で

比較して耐性率は, ほぼ横ばいであった。

カンピロバクター感染症の治療時に第一選択薬となっている EM に対する耐性菌出現状況を図 3 に示した。2009 年分離株の耐性率は, *C. jejuni* で 1.9% (156 株中 3 株), *C. coli* で 44.4% (9 株中 4 株) であった。2000 年から EM 耐性率の推移をみると, *C. jejuni* は 0.5%~数%で横ばいであったが, *C. coli* の耐性率は年々増加している傾向が認められた。

5. サルモネラ血清型 Manhattan

2000 年~2010 年におけるヒトおよび食品からのサルモネラ血清型 Manhattan 分離状況をみると, 2005 年 5 株, 06 年 5 株, 07 年 1 株, 08 年 2 株, 09 年 12 株, 10 年 10 株と 2009 年以降増加している傾向が認められた (図 4)。食品由来株は全て鶏肉関連由来であった。

2010 年に分離されたヒト由来株 4 株, 食品由来株 5 株 (1 株は実施せず) について薬剤感受性試験を実施した結果, TC, SM, Su 耐性が 5 株, TC, SM, Su, NA が 2 株, TC, Su および TC, SM, Su, ABPC, CTX が各 1 株であった。CTX 耐性株 1 株 (食品由来) は簡易検査で ESBL 産生菌であることが確認された (表 3)。

D. 考察

食品 5,435 検体中 MRSA は 7 検体 (0.13%) から検出された。MRSA が検出された食品のうち鶏肉と豚肉, 車えび, アナゴおよび酢の物はそれぞれ同一店から収去した食品であった。これらの食品は, ①原材料が汚染されていた, ②調理場での汚染, すなわち調理従事者の手指や調理器具を介した二次汚染の 2 つの可能性が考えられた。一方, 糞便検体では 7,443 検体中 26 株 (0.35%) から MRSA が検出された。これは腸管出血性大腸菌 0157 の健康人保菌率 (約 0.02%) およびサルモネラ保菌率 (約 0.03%)

よりも高い保菌率であった。MRSA のエンテロトキシンおよび TSST-1 産生性をみると、食品およびヒト由来株では、同じようなタイプを示していた。しかし、食品やヒト糞便由来株は、医療機関受診者から分離される MRSA とは異なるタイプであることが明らかとなった。

2009 年～2010 年に分離された大腸菌、サルモネラおよび腸管出血性大腸菌の合計 1,119 株について NDM-1 産生菌のスクリーニング試験を実施した結果、NDM-1 産生菌を疑う菌株は検出されなかったが、今後も継続して注視する必要がある。

2009 年に分離された下痢症患者由来 *C. jejuni* のキノロン剤耐性率は 33.3%であり、例年と同様の耐性率であった。一方、*C. coli* の耐性率は 77.8%であり、*C. jejuni* より耐性率が高い傾向が認められた。EM については、*C. jejuni* では 1.9%であり、ほとんど耐性菌は出現していないが、*C. coli* では、近年耐性率が増加傾向である。

近年分離数が増加しているサルモネラ血清型 Manhattan の薬剤耐性率を調べた結果、2010 年分離株 9 株の全てが 2 薬剤以上の多剤耐性菌であり、耐性率は非常に高かった。中でも食品由来株の 1 株は TC, SM, Su, ABPC, CTX の 5 薬剤に耐性を示し、簡易検査で ESBL 産生菌と確認された。今後、遺伝子型別試験など詳細に検討する予定である。

E. 結論

食品 5,435 検体中 MRSA は 7 検体 (0.13%) から検出された。糞便検体では、7,443 検体中 26 株 (0.35%) から MRSA が検出された。食品由来および糞便由来株のエンテロトキシンおよび TSST-1 産生性は SEC+T が最も多く、両者とも同じような傾向であった。しかし、このタイプは医療機関受診者から検出される MRSA では少なく、臨床材料由来株とヒト糞便および食品

由来株ではタイプが異なることが明らかとなった。

食肉から ESBL 産生大腸菌の検出を試みた結果、国産鶏肉からの分離が最も多く、次いで輸入鶏肉、国産牛内臓肉の順であった。豚肉からは検出されなかった。分離株の遺伝子型を調べた結果、国産鶏肉では CTX-M-9 グループが、輸入鶏肉では CTX-M-2 グループが最も多く、国産と輸入では異なる遺伝子型であった。

2009 年に分離された下痢症患者由来 *C. jejuni* のキノロン剤耐性率は 33.3%であり、例年と同様の耐性率であった。一方、*C. coli* の耐性率は 77.8%であり、*C. jejuni* より耐性率が高い傾向であった。EM 耐性の *C. jejuni* は 1.9%であり、ほとんど耐性菌は出現していないが、*C. coli* では、近年耐性率が増加傾向である。

近年、サルモネラ血清型 Manhattan の分離数が増加傾向である。食品由来株は全て鶏肉由来であった。分離株の耐性率は高く、今回実施した 9 株は全て 2 薬剤以上に耐性を示す多剤耐性菌であった。また、CTX 耐性の ESBL 産生菌も検出された。

今後も耐性菌出現状況に注意が必要である。

F. 健康危機情報

ヒトの MRSA 保菌率は 0.35%であり、腸管出血性大腸菌 O157 やサルモネラの健康保菌率より高かった。

C. coli の EM 耐性率は近年増加傾向にある。

サルモネラ血清型 Manhattan は、近年食肉から比較的高率に検出される。分離株の耐性率は非常に高く、また CTX に耐性を示す ESBL 産生菌も検出された。

G. 研究発表

1. 下島優香子, 井田美樹, 猪股光司, 樋口容子, 田端麻里, 河村真保, 畠山薫, 仲

真晶子, 甲斐明美: 食肉からの基質特異性
 拡張型βラクタマーゼ産生大腸菌の検出,
 第31回日本食品微生物学会学術総会, 2010
 年11月, 滋賀

31回日本食品微生物学会学術総会, 2010年
 11月, 滋賀

2. 小西典子, 尾畑浩魅, 齊木大, 上原さ
 とみ, 新井輝義, 門間千枝, 仲真晶子, 甲
 斐明美: 食品および糞便から分離されたメ
 チシリン耐性黄色ブドウ球菌について, 第

H. 知的財産権の出願・登録状況
 無し

I. 特許取得
 無し

**表1. 食品および糞便からの黄色ブドウ球菌および
 MRSAの検出**

由来	供試数	検出数	
		黄色ブドウ球菌	MRSA
食品	5,435	774 (14.2%)	7* (0.13%)
糞便	7,443	931 (12.5%)	26 (0.35%)

供試検体: 食中毒関連調査検体

食品: 2007年12月～2010年5月 糞便: 2008年5月～2010年5月

* MRSA陽性食品: 鶏肉、豚肉、牛内蔵肉、車エビ、アナゴ、焼鮭、酢物

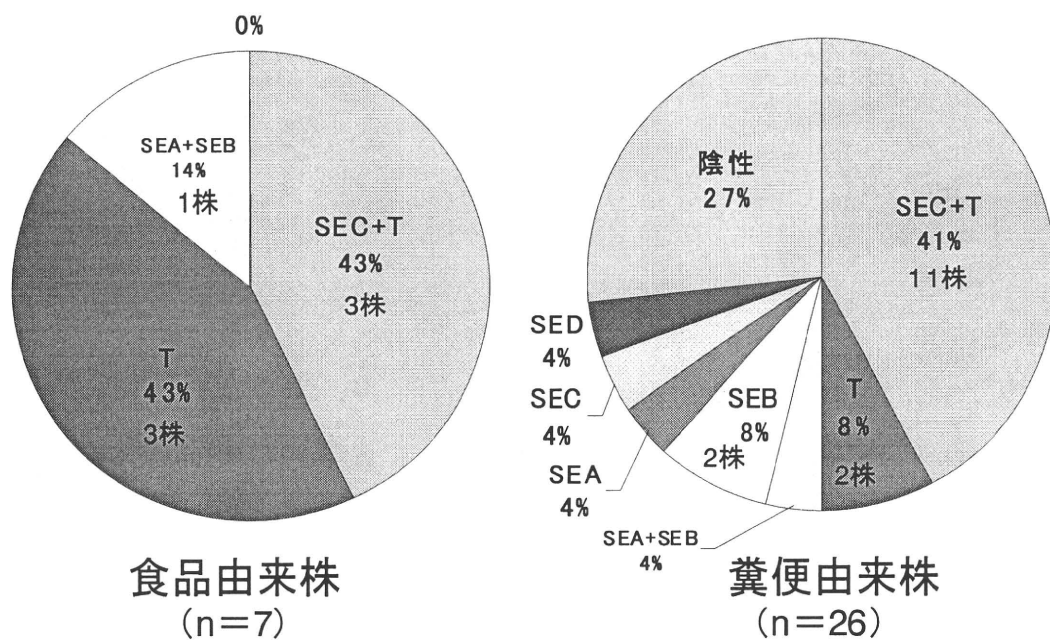


図1. MRSAのエンテロトキシンおよびTSST-1産生性

表2. ESBL産生大腸菌検出状況

検体	検体数	陽性検体数 (%)	
		糞便系大腸菌	ESBL産生菌
国産牛内臓肉	18	18 (100)	3 (16.7)
輸入牛肉	8	0 (0)	0 (0)
国産豚肉	5	2 (40.0)	0 (0)
輸入豚肉	14	2 (14.3)	0 (0)
国産鶏肉	28	28 (100)	12 (42.9)
輸入鶏肉(ブラジル産)	19	16 (84.2)	7 (36.8)
計	92	66 (71.7)	22 (23.9)

国産由来肉はCTX-M-9、CTX-M-1グループの順に、輸入鶏肉(ブラジル産)はCTX-M-2グループが多かった。

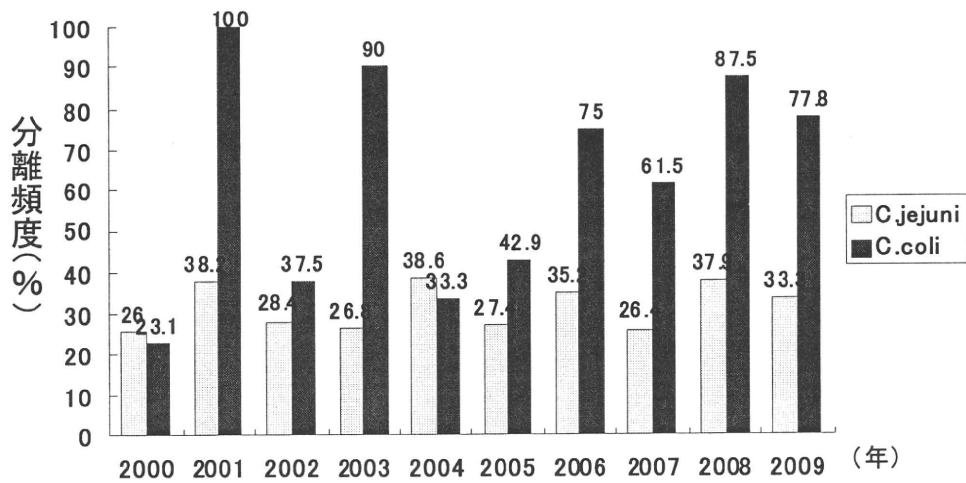


図2. ヒト由来*C.jejuni*,*C.coli*のニューキノロン剤に対する耐性菌検出状況

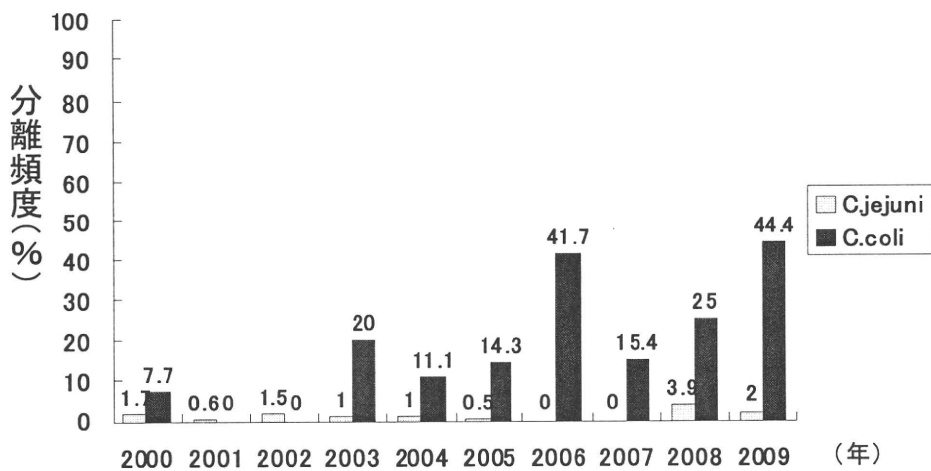


図3. ヒト由来*C.jejuni*,*C.coli*のErythromycinに対する耐性菌検出状況

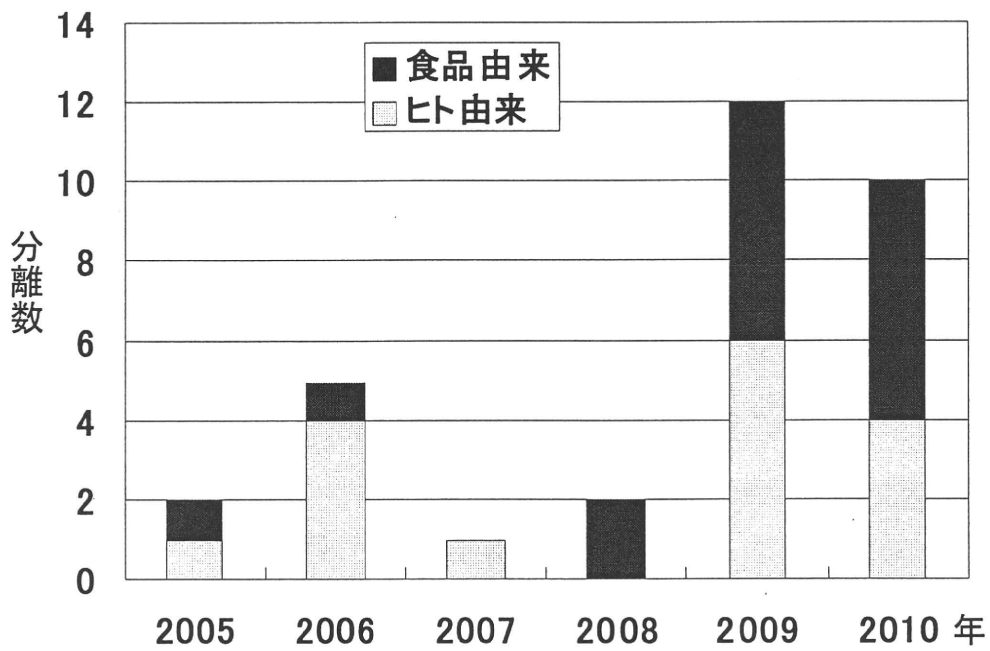


図4. ヒトおよび食品からの S. Manhattans 分離状況

表3. ヒトおよび食品由来 S. Manhattans の薬剤耐性パターン

耐性パターン		ヒト由来	食品由来
TC	Su	1	
TC	SM Su	3	2
TC	SM Su NA		2
TC	SM Su ABPC CTX		1
計		4	5

TC, SM, Su, ABPC, CTX耐性株: ESBL

平成 22 年度厚生労働省食品の安心・安全確保推進研究事業
「薬剤耐性食中毒菌に係る解析技術の開発及び
サーベイランスシステムの高度化に関する研究」

分担研究報告書

分担課題名： 食中毒菌の薬剤耐性獲得のリスクマネージメントに関する研究

研究分担者： 五十君静信（国立医薬品食品衛生研究所 食品衛生管理部）

研究分担者： 黒田 誠（国立感染症研究所 病原体ゲノム解析研究センター）

研究協力者： 石井良和（東邦大学医学部微生物・感染症学講座）

研究要旨

ESBL 産生 *E. coli* は、患者株が 498 株中 56 株であり、その検出頻度は 11.2%であった。鶏肉は高率に ESBL 産生 *E. coli* による汚染を受けており、12 検体全てから ESBL 産生株が分離された。全ての検査材料から検出された ESBL は CTX-M-型に属する β ラクタマーゼであった。患者、プロイラーおよび鶏肉において主要な ESBL は、それぞれ CTX-M-9 グループ、CTX-M-1 グループおよび CTX-M-2 グループであった。患者検体由来株の 39 株（69.6%）は ST131 との関連性を認めた。そのうちの 72%は *bla*_{CTX-M-9} 陽性であった。一方、健康なプロイラーおよび鶏肉から分離された *E. coli* で ST131 と関連性を認めた菌株は、それぞれ 27.2% および 8.3%であった。

A. 研究目的

基質特異性拡張型 β ラクタマーゼ（Extended-spectrum β -lactamase: ESBL）は、主として腸内細菌科に属する菌が産生する、オキシミノセファロスポリン薬に対する耐性因子である。2006 年頃までは諸外国と比較して本邦における検出頻度は 1~2%と低かった。しかし、2006 年を境としてその検出頻度の急激な上昇を認めており、2008 年には本邦の臨床材料から分離された *Escherichia coli* における ESBL 産生菌の割合は 8%を超え、2010 年の調査では 10%を超えている。また、当初本邦で分離される *Klebsiella pneumoniae* の中に ESBL

産生株が占める割合は 0.5%程度であったが、2008 年の頻度は 5%を超えている。

一方、健常成人も ESBL 産生菌をその腸内に保菌しているとの報告もある。また、本邦の家畜、特に家禽から ESBL 産生 *E. coli* の分離頻度が高いことも報告されていた。諸外国では、ESBL 産生 *E. coli* が市販の鶏肉から分離されることが報告されており、食物を介して耐性菌がヒトに拡散している可能性が考えられている。さらに、伴侶動物や野生動物からも ESBL 産生菌が検出されている。

これまで耐性菌は、抗菌薬に曝されたヒトや免疫能が低下した易感染宿主におい

て問題となるが、抗菌薬に暴露されていない健康人や環境ではあまり問題とならないと考えられていた。しかし、健康人や抗菌薬とあまり関係のない家畜や野生動物に耐性菌が拡散しているという事実、現在起こっている事象はこれまでの考え方では説明できない。また、耐性菌の分離率の急速な上昇もこれまでの考え方で説明することは困難である。

本研究では、急速に ESBL 産生 *E. coli* の分離頻度が上昇している理由を解明することを目的に研究を行った。具体的には患者検体、健康人の糞便、健康な肉用鶏および鶏肉からオキシミノセファロスポリン薬耐性 *E. coli* の分離を試み、その耐性因子を同定した。さらに、各種材料から分離された *E. coli* の起源を特定する目的で Multi-locus sequence typing (MLST) を実施した。

B. 研究方法

1. 菌株の収集

患者由来菌株は、全国規模の耐性菌サーベイランスで収集された 498 株の *E. coli* を対象とした。健康なブロイラーから分離された 11 株の *E. coli* をブロイラー由来株として本研究に供した。鶏肉由来株は東京都大田区内の食肉販売店から購入し、氷冷して持ち帰った 12 検体の鶏胸肉 20g を無菌的に採取し、一晚 Luria-Bertani 培地で培養後、CHROMagar ESBL medium (CHROMagar, Paris) で選択した。

2. ESBL の同定

CHROMagar ESBL medium 上に発育した ESBL 産生大腸菌が疑われた菌株は、BD Phoenix system (日本ベクトン・ディッキンソン、東京) によって菌種同定を実施し、さ

らに Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) が推奨する ESBL 確認試験で表現型の確認試験を行った。ESBL の確認が陽性となった *E. coli* は、定法に従って PCR 法で各菌株が保有する ESBL をコードする遺伝子をサブグループに分類した。サブグループに分けられた ESBL をコードする遺伝子は、構造遺伝子の塩基配列を決定し、保有する ESBL をコードする遺伝子の特定を試みた。

3. MLST による *E. coli* の解析

CLSI の推奨する方法で ESBL の産生が確認され、ESBL をコードする遺伝子あるいはそのサブグループが特定された *E. coli* は、定法に従って MLST の型別を実施した。具体的には、*E. coli* MLST web site (<http://www.mlst.net/>) が定める 7 遺伝子のプライマーを用いて増幅した DNA 産物の塩基配列を同 site のツールを用いて解析した。

C. 研究結果

1. ESBL 産生 *E. coli* の検出

ESBL 産生 *E. coli* は、患者株が 56 株であり、その検出頻度は 11.2% であった。なお、今回購入した全ての鶏肉から ESBL 産生 *E. coli* が分離された。

2. 各種材料から分離された *E. coli* が保有する ESBL をコードする遺伝子の種類

検出された ESBL は全て CTX-M-型に属する βラクタマーゼであった。患者、ブロイラーおよび鶏肉において主要な ESBL は、それぞれ CTX-M-9 グループ (69.6%)、CTX-M-1 グループ (72.7%) および CTX-M-2 グループ (58.3%) であった。何れの材料からも CTX-M-8/25 グループの酵素は検出されなかった。