

厚生労働省 食品の安全確保推進研究事業
「食品由来細菌の薬剤耐性サーベイランスの強化と国際対応に関する研究」

平成 24-26 年度 総合分担研究報告書

分担課題名：食品汚染及びヒト腸内細菌の薬剤耐性疫学

研究分担者 田口真澄 大阪府立公衆衛生研究所
研究協力者 河原隆二 大阪府立公衆衛生研究所
原田哲也 大阪府立公衆衛生研究所
勢戸和子 大阪府立公衆衛生研究所
久米田裕子 大阪府立公衆衛生研究所

研究要旨：

薬剤耐性菌が食品を介してヒトに健康被害をおよぼす危険性を評価する科学的根拠の提供を目的として、食品を汚染している病原細菌の薬剤耐性とヒト由来病原細菌の薬剤耐性の関連を調べた。

市販の鶏肉の大腸菌調査では、同一検体から複数の ESBL の型が検出され、さらに AmpC 産生菌も同時に検出された。そして ESBL 産生大腸菌と AmpC 産生大腸菌が高率に存在することが明らかになった。鶏肉から検出されるサルモネラの中で最も多い血清型 Infantis では、2009 年以降 AmpC 産生菌が多い傾向が続いている。しかし他の血清型ではこのような傾向が認められなかった。

カンピロバクターのフルオロキノロン耐性は、ヒト由来株、鶏肉由来株のいずれも 2010 年以前の成績と比較して耐性率の上昇が認められた。

A. 研究目的

近年世界各国で、食品および食用動物から第三世代セファロスポリン系抗菌剤に耐性の大腸菌やサルモネラ属菌の分離が報告されており公衆衛生上の問題となっている。特に家禽においては、基質特異性拡張型 β -ラクタマーゼ(ESBL)

またはプラスミド性 AmpC 型 β -ラクタマーゼ (AmpC) 産生株の増加が報告されており、ヒトの感染症との関連性の監視が求められている。

日本国内では食品からの薬剤耐性株検出の年次推移の詳細な報告はなく、薬剤耐性菌がヒトに影響を及ぼしているかどうかの現状は明らか

ではない。本研究では薬剤耐性菌が食品を介してヒトに健康被害をおよぼす危険性を評価する科学的根拠の提供を目的として、食品を汚染している病原細菌の薬剤耐性と、ヒト由来病原細菌の薬剤耐性の関連を調べる。

B. 研究方法

(1) 国内産鶏肉の ESBL および AmpC 産生大腸菌

2012年に国内産鶏肉55検体、2013年に国内産鶏肉24検体を検査した。大腸菌検出は、検体25gを採取しBuffered Peptone Waterで増菌培養し、分離培養には2012年は市販生培地の chromID ESBLのみを、2013年は chromID ESBL およびセフォキシチン20µg/mL加CHROMagar ECCの2種類の平板培地を使用した。

ESBL産生はCLSIのディスク拡散法、AmpC産生は3-アミノフェニルボロン酸を用いたダブルディスクシナジー法で表現型を確認した(図1)。その後ESBL産生菌は遺伝子のグループ別(CTX-M-1、CTX-M-2、CTX-M-9、CTX-M-8/25、TEM、SHV)を行い、AmpC産生菌はプラスミド性遺伝子(ACC、CIT、DHA、EBC、FOX、MOX)の検出を行った。

(2) 国内産鶏肉の ESBL および AmpC 産生サルモネラ

2006年~2014年の9年間に国内産鶏肉から分離した948株を用いて、血清型の変化と、ESBLおよびAmpCの表現型について調べた。

検査方法は、検体25gを採取し一次増菌培養にはBuffered Peptone Water、二次増菌培養にはRappaport-Vassiliadis Enrichment brothを用い、XLD寒天培地ならびにBGS培地(プリリアント

グリーン寒天培地+スルファピリジン)で分離培養を行った。薬剤を添加した増菌培地および分離培地は使用しなかった。

確認培地でサルモネラの性状を示した株について血清型別と薬剤感受性試験を実施した。薬剤感受性試験は1検体につき1株、複数の血清型が同一検体から分離された場合は複数株をCLSIのディスク感受性試験実施基準に基づき、センシディスク(BD)を用いて行った。供試薬剤はアンピシリン(ABPC)、クロラムフェニコール(CP)、ストレプトマイシン(SM)、テトラサイクリン(TC)、カナマイシン(KM)、ゲンタマイシン(GM)、ST合剤(ST)、ホスフォマイシン(FOM)、ナリジクス酸(NA)、シプロフロキサシン(CPFX)、セフトキシム(CTX)、セフポドキシム(CPDX)、イミペネム(IPM)、メロペネム(MEM)、アミカシン(AMK)、スルフィソキサゾール(Su)の16剤を供試した。

ESBLおよびAmpC産生サルモネラのスクリーニングにはセフポドキシムを用い、セフポドキシム耐性株についてESBLおよびAmpC産生性を大腸菌と同じ方法で調べた。

(3) カンピロバクター

ヒト由来株は2011年~2014年に分離した散発下痢症患者由来147株および食中毒患者由来(有症苦情事例を含む)148株の合計295株を供試した。鶏肉由来株は2014年に国内産鶏肉から分離した56株を供試した。薬剤感受性試験はノルフロキサシン(NFLX)、OFLX、CPFX、NA、TC、エリスロマイシン(EM)の6剤で、センシディスクを用いて行った。

(4) ヒト由来腸管出血性大腸菌

2012年~2013年に患者および健康者から分離

された 121 株を供試した。薬剤感受性試験は鶏肉由来サルモネラと同じ方法で行った。

C. 研究結果と考察

(1) 国内産鶏肉の ESBL および AmpC 産生大腸菌

2012 年は 44 検体 (80.0%) から ESBL 産生大腸菌、2 検体 (3.6%) から AmpC 産生大腸菌が検出された。2013 年は ESBL 産生大腸菌と AmpC 産生大腸菌が両方検出された検体が 22 検体 (91.7%) あり、ESBL のみ検出は 1 検体、AmpC のみ検出は 1 検体であった。また、ESBL 産生大腸菌はすべて chromID ESBL で検出され、AmpC 産生大腸菌はすべてセフォキシチン 20 μ g/mL 加 CHROMagar ECC で検出され、分離平板による差が明らかになった (表 1)。

2012 年の遺伝子のグループ型別は 46 株で行い、CTX-M-1 グループ 8 株、CTX-M-2 グループ 23 株、CTX-M-8/25 グループ 3 株、CTX-M-9 グループ 5 株、SHV 型 7 株であった。AmpC 産生大腸菌はいずれも CMY-2 であった (表 2)。

2013 年の遺伝子のグループ型別は、ESBL 産生大腸菌では CTX-M-1 グループ 7 株、CTX-M-2 グループ 30 株、CTX-M-8/25 グループ 14 株、CTX-M-9 グループ 25 株、SHV 型 22 株、TEM 型 5 株であった。同一検体由来株でも異なる型が検出され、12 検体で複数の型を検出した。一方、AmpC 産生大腸菌はいずれもプラスミド性の CIT 遺伝子保有であった (表 3)。

2012 年に国内の養鶏団体がセフォチオフルの使用に関して自主的に注意喚起を行ったことから、農場の鶏糞からの ESBL/AmpC 産生大腸菌の検出は 2012 年から減少している。しかし市販鶏肉ではその後もまだ高率に存在していること

が明らかになった。

(2) 国内産鶏肉のサルモネラ

大阪府の鶏肉から分離したサルモネラの血清型は、2011 年までは *Salmonella* *Infantis* が圧倒的に多かったが、2012 年からは、*S.* *Schwarzengrund* や *S.* *Manhattan* など、他の血清型の分離頻度が高くなり、変化が認められている (図 2)。

薬剤感受性試験を実施した 700 株のうちセフポドキシム耐性は 127 株 (18.1%) あり、ESBL 産生菌が 34 株、AmpC 産生菌が 93 株であった。ESBL 産生 34 株の血清型は *S.* *Infantis* 24 株、*S.* *Manhattan* 7 株、そして *S.* *Schwarzengrund*、*S.* *Hadar*、*S.* *Typhimurium* が各 1 株であった。AmpC 産生菌ではさらに *S.* *Infantis* の占める割合が高く、93 株中 90 株が *S.* *Infantis* であった。他の血清型では *S.* *Manhattan* のセフポドキシム耐性 7 株が全て ESBL 産生であるなど、血清型による差が認められた (表 4)。

S. *Infantis* の ESBL および AmpC 産生菌の年次変化をみると、2009 年から AmpC 産生菌の急増が認められ、2013 年も 13 株中 6 株 (46.2%) が AmpC 産生であった (図 3)。

(3) カンピロバクター

ヒト由来菌株：*C. jejuni* では散発下痢症患者で 89 株 (63.6%)、食中毒患者で 94 株 (74.6%) がフルオロキノロン耐性であった。どちらも 2009～2010 年の耐性率よりも高率であった (表 1, 2)。
C. coli では散発下痢症患者で 4 株 (57.1%)、食中毒患者で 6 株 (27.3%) がフルオロキノロン耐性であった。

鶏肉由来菌株：*C. jejuni/coli* (*C. jejuni* と *C. coli*

の同定は未実施)のフルオロキノロン耐性率は62.5%であり、2009~2010年の40.8%よりも高率であった(表7)。

フルオロキノロン耐性率の年次変化：散发下痢症患者由来 *C. jejuni* のフルオロキノロン耐性をみると、2011年以降は2010年以前の耐性率よりも高率になった(図4)。

(4) 腸管出血性大腸菌：

血清群 O157 では1剤以上に耐性を示す株は95株中9株(9.5%)であった。CTX耐性株が1株あり、その株は O157:H7 でプラスミド性 AmpC 産生株であった。血清群 O26 では1剤以上に耐性を示す株は11株中5株(45.5%)であった。NA耐性は血清群 O111 の1株に認められた(表8)。

D. 結論

市販の鶏肉には ESBL 産生大腸菌と AmpC 産生大腸菌が高率に存在することが明らかになった。そして同一検体から複数の ESBL の型が検出され、さらに AmpC 産生菌も同時に検出される事も判明した。2012年に国内の養鶏団体がセフォチオフルの使用に関して自主的に注意喚起を行ったことから、農場の鶏糞からの ESBL/AmpC 産生大腸菌の検出は2012年から減少している。しかし市販鶏肉では2013年になっても高率に存在していることが明らかになった。

サルモネラでは、市販の鶏肉から検出される血清型に変化の傾向が認められた。2011年までは *S. Infantis* が圧倒的に多く検出される血清型であったが、2012年以降は、*S. Schwarzengrund* や *S. Manhattan* など、他の血清型の分離頻度が高く

なり、今後の動向が注目される。*S. Infantis* では2009年以降 AmpC 産生菌が多い傾向が続いているが、他の血清型ではこのような傾向が認められなかった。

カンピロバクターのフルオロキノロン耐性は、ヒト由来株、鶏肉由来株のいずれも2010年以前の成績と比較して耐性率の上昇が認められた。

E. 研究発表

(論文発表)

- 1) Taguchi M, Kawahara R, Seto K, Harada T, Kumeda Y: Extended - Spectrum β -Lactamase- and AmpC β -Lactamase - Producing *Salmonella enterica* Strains Isolated from Domestic Retail Chicken Meat from 2006 to 2011. Jpn. J. Infect. Dis.2012, 65: 555-557.
- 2) Harada T, Hirai Y, Itoh T, Hayashida M, Seto K, Taguchi M, Kumeda Y: Laboratory investigation of an *Escherichia coli* O157:H7 strain possessing a *vtx2c* gene with an IS1203 variant insertion sequence isolated from an asymptomatic food handler in Japan. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 2013, 77: 176-178.
- 3) Harada T, Itoh K, Yamaguchi Y, Hirai Y, Kanki M, Kawatsu K, Seto K, Taguchi M, Kumeda Y: A foodborne outbreak of gastrointestinal illness caused by enterotoxigenic *Escherichia coli* serotype O169: H41 in Osaka, Japan. Jpn. J. Infect. Dis. 2013, 66: 530-533.
- 4) 田口真澄：食品由来細菌の薬剤耐性の疫学化学療法の領域、29：48-54,2013.

- 5) Kawahara R, Seto K, Taguchi M, Nakajima C, Kumeda Y, Suzuki Y : Characterization of third-generation cephalosporin-resistant Shiga toxin-producing strains of *Escherichia coli* O157:H7 in Japan. (投稿中)

(口頭発表)

- 1) 田口真澄、勢戸和子、河原隆二、原田哲也、久米田裕子 : 鶏肉の ESBL、衛生微生物技術協議会第 33 回研究会、2012 年 6 月、神奈川
- 2) 田口真澄 : 大阪府におけるカンピロバクター食中毒の動向および鶏肉からのカンピロバクター検出状況、第 5 回日本カンピロバクター研究会、2012 年 11 月、大阪
- 3) 勢戸和子、神吉政史、原田哲也、田口真澄 : 大阪府で分離された O157 以外の志賀毒素産生性大腸菌 (non-O157 STEC) の特徴—ヒト由来株と食品由来株の比較、第 17 回腸管出血性大腸菌出血性大腸菌感染症研究会、2013 年 7 月、つくば
- 4) 田口真澄、河原隆二、勢戸和子 : 市販鶏肉には AmpC 型 β -lactamase 産生大腸菌と ESBL 産生大腸菌が同率に存在する、第 87 回日本細菌学会総会、2014 年 3 月、東京

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

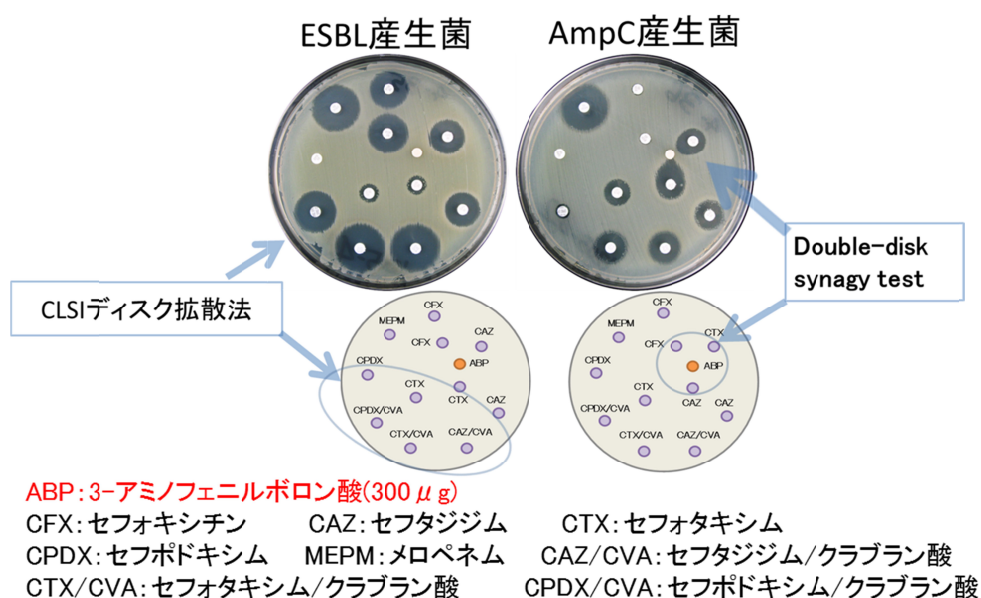


図1 ESBLおよびAmpC産生菌の検出方法

表1 国産鶏肉からのESBL/AmpC産生大腸菌検出

年	検体数	ESBL/AmpC陽性検体	ESBL産生大腸菌検出		AmpC産生大腸菌検出	
			chromID ESBL agar	セフォキシチン加 CHROMagar ECC	chromID ESBL agar	セフォキシチン加 CHROMagar ECC
2012年	55	46 (83.6%)	44 (80.0%)		2 (3.6%)	
2013年	24	24 (100%)	23 (95.8%)	0	0	23 (95.8%)

表2 2012年のESBL/AmpC産生大腸菌型別成績

型	菌株数	血清型(菌株数)
CTX-M-1	3	O111:H4(2), O8:H19(1)
CTX-M-14	5	O166:HUT(2), OUT(3)
CTX-M-15	2	OUT(2)
ESBL CTX-M-2	23	O166:H45(1), O15:H10(3), O111:HNM(4), O166:HUT(1), O157:HNM(1), OUT(13)
CTX-M-25	3	O166:HUT(1), OT(2)
CTX-M-55	3	OUT(3)
SHV-12	7	O114:HNM(2), O18:H7(1), OUT(3)
AmpC CMY-2	2	OUT(2)

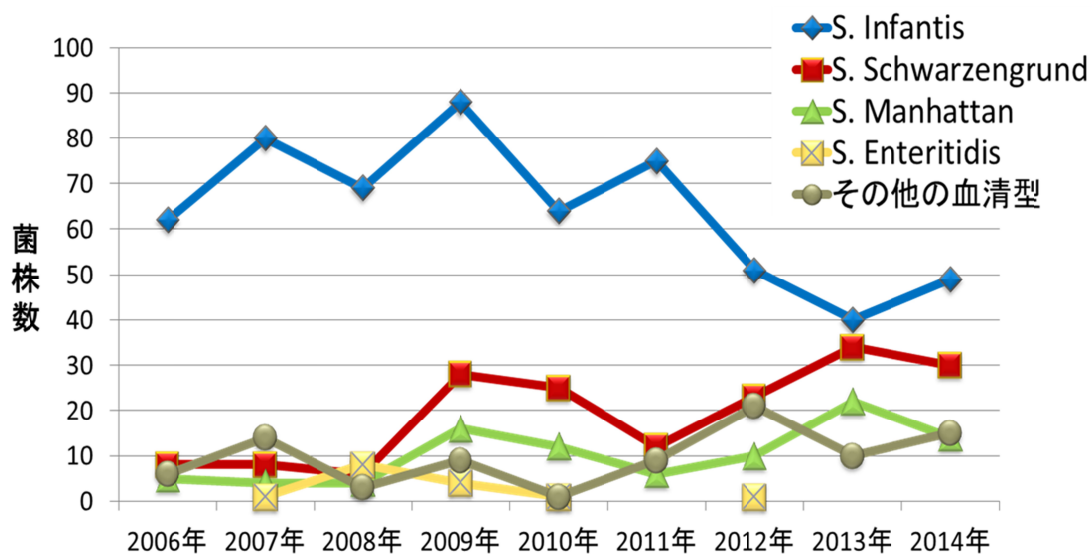


図2 大阪府内で入手した国産鶏肉由来サルモネラの血清型別検出数

表3 2013年のESBL/AmpC産生大腸菌遺伝子型別成績

検体 番号	販売 店	供試 株数	ESBL						AmpC			
			菌株数	CTX-M (グループ)				SHV	TEM	菌株数	CMY-2	CIT まで
				-1	-2	-9	-8/25					
1	Q	9	4		1			3		5	5	
2	Q	10	5	1				4		5	5	
3	R	10	5		2	3				5	5	
4	R	7	4	1	3					3	3	
5	R	4	2		2					2	2	
6	G	10	5		1		3	1		5	5	
7	G	10	5		4	1				5	5	
8	G	10	5	1		2	2			5	5	
9	S	1	0							1	1	
10	T	10	5		4	1				5	2	3
11	T	5	3		3					2	2	
12	U	7	5				5			2	2	
13	U	10	5		1		4			5	5	
14	U	9	5						5	4	4	
15	U	10	5		5					5	5	
16	V	6	1		1					5	5	
17	V	5	5			5				0		
18	V	10	5	2		3				5	5	
19	V	10	5	2		2		1		5	5	
20	W	10	5		3			2		5	5	
21	W	10	5					5		5	5	
22	X	9	5					5		4		4
23	Y	10	5			5				5	5	
24	Y	9	4			3		1		5	5	
合計		201	103	7	30	25	14	22	5	98	91	7

表4 サルモネラのセフトロキサシム耐性株数

血清型	菌株数	セフトロキサシム 耐性株		
		合計	ESBL	AmpC
<i>S. Infantis</i>	472	114	24	90
<i>S. Schwarzengrund</i>	109	1	1	
<i>S. Manhattan</i>	59	7	7	
<i>S. Hadar</i>	10	1	1	
<i>S. Typhimurium</i>	7	1	1	
<i>S. Heidelberg</i>	1	1		1
<i>S. (1) O7:HNM</i>	1	1		1
<i>S. Enteritidis</i>	15			
その他	26	1		1
合計	700	127	34	93

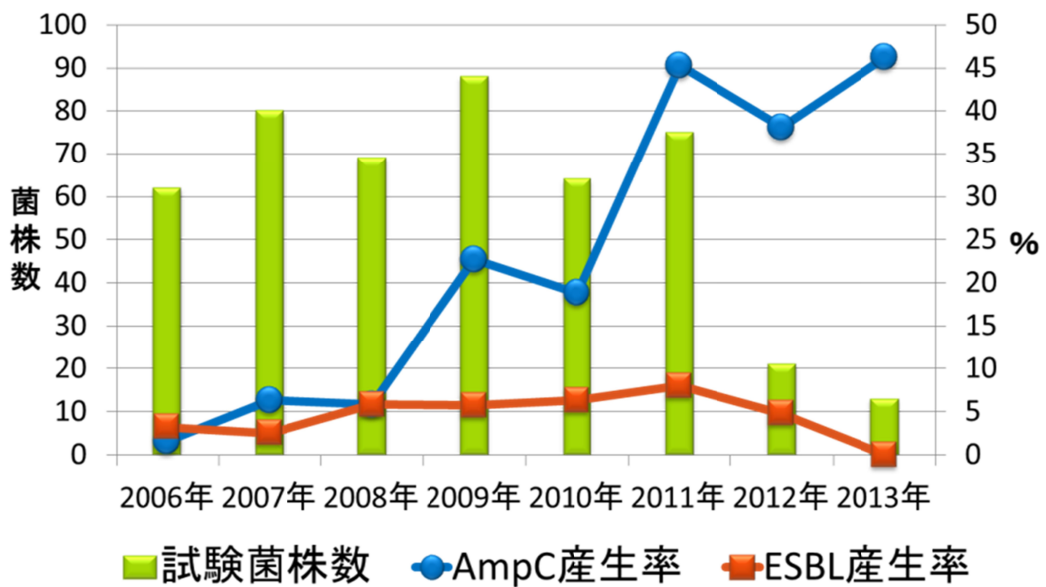


図3 *S. Infantis*のESBLおよびAmpC産生率の年次変化

表5 カンピロバクターの薬剤感受性試験成績
散発下痢症由来株 (2011-2014年)

薬剤耐性パターン	2011年	2012年	2013年	2014年	散発合計	2009-2010年
NFLX,OFLX,CPFX,NA,EM				1	1	
NFLX,OFLX,CPFX,NA,TC	25	8	13	4	50	31
NFLX,OFLX,CPFX,NA	16	6	9	7	38	35
<i>C. jejuni</i> フルオロキノロン耐性 小計	41(59.4%)	14(100%)	22(61.1%)	12(57.1%)	89(63.6%)	66(41.%)
TC	9		3		12	25
感受性	19		11	9	39	70
<i>C. jejuni</i> 合計	69	14	36	21	140	161
NFLX,OFLX,CPFX,NA,TC	1		1	1	3	3
NFLX,OFLX,CPFX,NA				1	1	3
<i>C. coli</i> フルオロキノロン耐性 小計	1(25%)		1(100%)	2(100%)	4(57.1%)	6(75.%)
TC,EM						1
TC	1				1	
感受性	2				2	1
<i>C. coli</i> 合計	4		1	2	7	8

供試薬剤: ノルフロキサシン(NFLX)、オフロキサシン(OFLX)、シプロフロキサシン(CPFX)、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)

表6 カンピロバクターの薬剤感受性試験成績
食中毒事例由来株 (2011-2014年)

薬剤耐性パターン	2011年 22事例	2012年 9事例	2013年 19事例	2014年 26事例	合計 76事例	2009- 2010年 41事例
NFLX,OFLX,CPFX,NA,TC	6	6	12	19	43	25
NFLX,OFLX,CPFX,NA	9	8	18	16	51	23
<i>C. jejuni</i> フルオロキノロン耐性 小計	15(71.4%)	14(70%)	30(83.3%)	35(71.4%)	94(74.6%)	48(55.2%)
TC	2		1	2	5	7
感受性	4	6	5	12	27	32
<i>C. jejuni</i> 合計	21	20	36	49	126	87
NFLX,OFLX,CPFX,NA,TC	3			3	6	4
NFLX,OFLX,CPFX,NA						1
<i>C. coli</i> フルオロキノロン耐性 小計	3(60%)			3(33.3%)	6(27.3%)	5(71.4%)
TC,EM						1
TC	1			1	2	1
感受性	1	1	7	5	14	
<i>C. coli</i> 合計	5	1	7	9	22	7

表7 鶏肉由来カンピロバクター *jejuni* / *coli* の薬剤感受性試験成績

薬剤耐性パターン	2014年	2009-2010年
NFLX,OFLX,CPFX,NA,TC,EM	1	1
NFLX,OFLX,CPFX,NA,TC	17	45
NFLX,OFLX,CPFX,NA	17	42
NFLX,NA		1
フルオロキノロン耐性 小計	35(62.5%)	89(40.8%)
TC	4	42
感受性	17	87
<i>C. Jejuni</i> / <i>coli</i> 合計	56	218

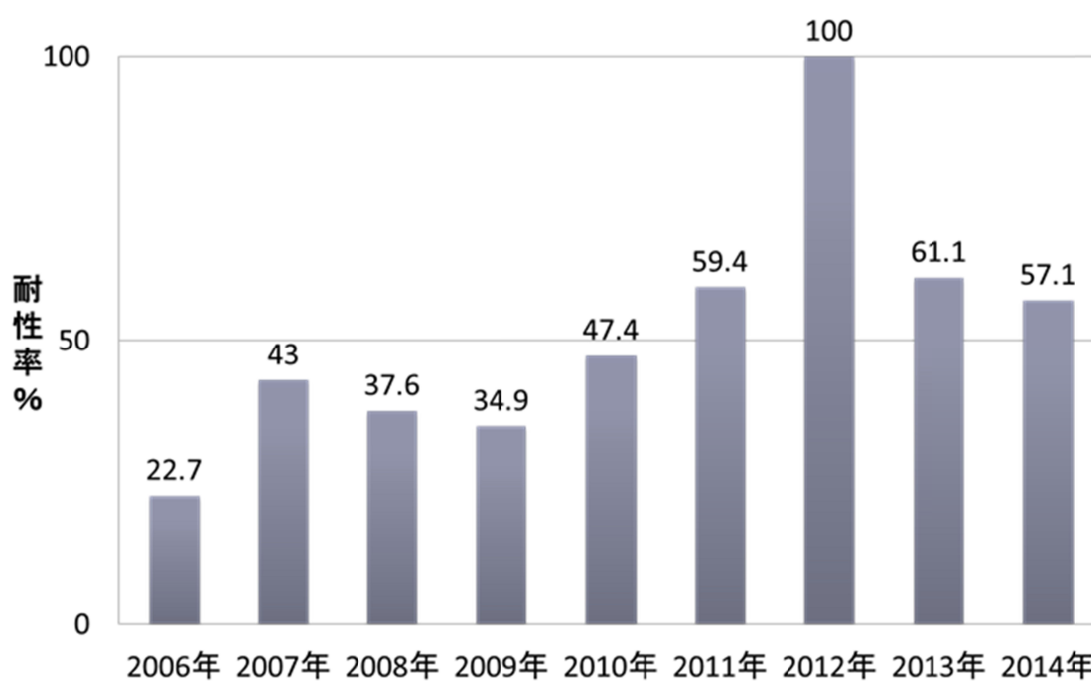


図4 散発下痢症由来 *C. jejuni* のフルオロキノロン耐性率

表8 腸管出血性大腸菌の薬剤感受性試験成績(2012-2013年)

血清群	耐性パターン	2012年	2013年	合計	備考
O157 (95株)	ABPC, SM, TC, CP, CPDX, CTX, Su	1		1	AmpC
	ABPC, SM, TC, KM, CP, Su		1	1	
	ABPC, SM, TC, ST, Su		1	1	
	ABPC, SM, TC, Su	2		2	
	ABPC, SM, Su	1		1	
	SM, TC, CP, Su		1	1	
	SM, Su	1		1	
	TC	1		1	
	感受性	47	39	86	
O26 (11株)	ABPC, SM, TC, ST, Su		2	2	家族
	SM, Su	1		1	
	ABPC		1	1	
	FOM		1	1	
	感受性	2	4	6	
O103	SM, Su		2	2	家族
	感受性		1	1	
O111	ABPC, SM, TC, KM, Su	1		1	
	ABPC, SM, TC, NA, Su		1	1	
O121	感受性	1	3	4	
O91	SM, TC, Su	1		1	
O88	感受性	1		1	
O113	感受性	1		1	
O148	感受性	1		1	
O4	感受性		1	1	
OUT	感受性		1	1	
計		62	59	121	