

201522030A

厚生労働科学研究費補助金食品の安全確保推進研究事業
食品由来薬剤耐性菌の発生動向及び衛生対策に関する研究
(H27-食品-一般-008)

平成 27 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 渡邊 治雄

平成 28 年 (2016 年) 3 月

厚生労働科学研究費補助金 食品の安全確保推進研究事業
平成 27 年度 総括・研究分担報告書

目次

I. 平成 27 年度総括研究報告書

食品由来薬剤耐性菌の発生動向及び衛生対策に関する研究

研究代表者 渡邊 治雄 国立感染症研究所 3

II. 平成 27 年度分担研究報告書

1. 家畜由来腸内細菌の疫学的研究：JVARM と JANIS の連携について

研究分担者 川西 路子 農林水産省動物医薬品検査所 11

2. 家畜に由来する薬剤耐性菌が食品へ伝播する経路に関する研究

研究分担者 浅井 鉄夫 岐阜大学大学院連合獣医学研究科 18

3. 全国地方衛生研究所において分離される薬剤耐性菌の情報収集体制の構築

研究分担者 四宮 博人 愛媛県立衛生環境研究所 22

4. ヒトおよび食品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 35

5. ヒト及び食品由来食中毒菌の薬剤耐性の疫学

研究分担者 倉園 貴至 埼玉県衛生研究所 42

6. 国内の市販鶏肉における ESBL 酸性大腸菌およびバンコマイシン耐性腸球菌 VRE の分布状況とその諸性状に関する研究

研究分担者 五十君 静信 国立医薬品食品衛生研究所 53

7. JANIS データとの連携に関する研究

研究分担者 柴山 恵吾 国立感染症研究所 63

8. 非チフスサルモネラ症の起因菌の薬剤耐性に関する研究

研究分担者 大西 真 国立感染症研究所 66

9. 食肉中の多剤耐性菌（VRE, ESBL 産生菌など）に関する調査、研究
研究分担者 富田 治芳 群馬大学大学院医学系研究科 72

Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表 80

食品由来薬剤耐性菌の発生動向及び衛生対策に関する研究

代表研究者 渡邊治雄 国立感染症研究所客員研究員

研究要旨:WHO は 2015 年 5 月の総会に Global action plan on AMR を提出し、各国に 2 年以内に National action plan を作成するように求めた。”One health “に基づいた対策を立てることを要求している。当該研究班においては、家畜等の耐性菌モニタリング体制 JVARM とヒトの院内感染耐性菌サーベイランス体制 JANIS で得られたデータを一元的に解析できるようにした。その結果見えてきたことは、①ヒト由来大腸菌のニューキノロン耐性率は 2013 年度には約 35%に達し、この 10 年で 3 倍にも増加してきていたが、肉用鶏、採卵鶏、肉用牛、豚らの畜産由来大腸菌の耐性率はこの 10 年間で、10%以内で経緯していた。②第 3 世代のセファロスポリン系薬剤については、ヒトでは年々耐性率が増加し、2013 年には 20%近くまでになっていた。家畜では肉用鶏からの分離率が高く、2010 年までは 10~15%を占めていたが、2010 年以降急激に減少し、2013 年には 2%前後までになっていた。肉用鶏における減少は、農家がセフトフルの鶏への投与を自主的に中止した時期と一致しており、選択圧が取り除かれた影響と考えられた。JVARM では、家畜由来の大腸菌、サルモネラ、カンピロバクター等の腸内細菌の耐性データを収集できる。一方、JANIS は病院内感染に由来する病原体の耐性菌のデータが主であるので、呼吸器系細菌や泌尿器系細菌が主であり、サルモネラ、カンピロバクター、下痢原性腸内細菌のデータの収集が少ない。そこを補うためには、感染症法による感染症法発生動向調査（病原体サーベイランスを含む）、食品衛生法による食中毒起因菌の検査を担当している地方衛生研究所（地研）のデータを取り込む必要がある。今回、地研における耐性菌検査の実態把握を行った。その結果、75 地研中の 59 地研（78.7%）が何らかの薬剤耐性検査を実施していることが判明し、そのうち 26~36 地研がサルモネラ、EHEC、カンピロバクターヒト由来株の耐性検査を、17~23 地研がそれらの食品由来株の耐性検査を、それぞれ実施していることが明らかになった。今後これらのデータを JVARM-JANIS のシステムの中に取り込む体制の構築を行い、One-health での対応を確立する必要がある。

分担研究者:

四宮博人	愛媛県立衛生環境研究所
五十君静信	国立医薬品食品衛生研究所
大西 真	国立感染症研究所
川西路子	農水省動物医薬品検査所
浅井鉄夫	岐阜大学大学院連合獣医学研究科
甲斐明美	東京都健康安全研究センター
倉園貴至	埼玉県衛生研究所
柴山恵吾	国立感染症研究所
富田治芳	群馬大学大学院

A. 研究目的:

家畜に由来する薬剤耐性菌が畜産食品を介してヒトに伝播し、ヒトの健康に危害を与える可能性について評価するため、モニタリング体制が構築されてきている。WHO は、世界における耐性菌の実態を明らかにするため Advisory Group on Integrated Surveillance of Antimicrobial Resistance (AGISAR) を設立し、食中毒菌などの薬剤耐性の国際的なサーベイランス体制の確立や検査法の統一を図ろうとしている。また、WHO は耐性菌の世界的コントロー

ルをめざし、2015 年の WHO 総会において global action plan を示し、各国に今後 5 年間の耐性菌対策の行動計画 (National action plan) を作成することを求めた。研究代表者は WHO の委員として action plan の作成に携わってきた。この action plan においては “One Health” の立場からの integrated surveillance の構築を求めている。研究代表者は今までに国内においては厚労省、農林省に働きかけ、各省で行っている耐性菌サーベイランスの統合を行ってきた。農林省で動物を対象に行われている耐性菌モニタリングシステム JVARM と厚労省で行われているヒトにおける院内感染症耐性サーベイランス JANIS のデータを総合的に解析できるようにすることを目指してきた。今回の研究班では、JVARM-JANIS の相互変換の構築とその効果の評価を行うこと、及び食品由来細菌の耐性状況のデータを組織的に収集し、動物—ヒトのデータに繋ぐ体制の構築を行うことを目的とする。JVARM-JANIS においては、食品由来細菌やヒトからの食中毒関連細菌の薬剤耐性のデータが収集できていないので、その分野の検査を行って

いる地方衛生研究所の集まりである全国地方衛生研究所協議会を班員に加え、協力体制を組むことにした。国内で分離された臨床、食品および家畜由来耐性菌の比較解析を行い、その関連性を解明することにより、耐性菌のグローバルな循環を明らかにし、リスク評価および行政対策に供することができる。これらのデータの作成とその維持管理を行える体制を構築することにより、WHOが求める”One Health”における integrated surveillance が構築でき国際的なネットワークへの対応が可能となる(図1)。

B. 研究方法：

- (1) 食品、家畜および医療分野の検査手法(薬剤の種類、遺伝子検査法など)を相互比較可能にして、第3世代セファロスポリン耐性大腸菌、サルモネラ等の腸内細菌における耐性遺伝子の同定及び各種セフェム系薬剤に対する感受性試験を実施する。WHOのAMR会議に参加(渡邊)し、その情報を還元するとともに、サーベイランスの統合の調整を行う。サルモネラ、大腸菌、カンピロバクターについて、動物由来株(担当：川西、浅井)、食品由来株(四宮、甲斐、倉園、五十君、富田)、人由来株(四宮、甲斐、倉園、大西、柴山)の菌株の収集、耐性表現型、耐性遺伝子の解析を行う。食品由来VREの解析を行う(富田)。JANIS院内感染由来の菌の収集、解析を行う(柴山)。
- (2) JVARMの大腸菌のアンチバイオグラムを作成するために活用したJANIS集計用プログラムを一部改変し移植したJVARMデータサーバーに、平成26年度に分離されたJVARMの大腸菌のデータを加工・入力し、アンチバイオグラムを作成した。それによりお互いのデータの相互変換および比較ができるようにする。JANISとJVARMでの測定薬剤の相関の確認(第3世代セファロスポリン系)JVARMで2010年から2013年に収集した118株について、セフトオフル(CTF)に対するMIC値を寒天平板希釈法により測定した。既にJVARMで測定した微量液体希釈のセフトオキシム(CTX)のMICと今回測定したCTXのMICについて、相関係数(スピアマン)、感度及び特異度を計算し、相関性について検討した。JVARMで2009年に収集した113株のレボフロキサシン(LVFX)に対するMIC値を微量液体希釈により測定した。既にJVARMで測定した寒天平板希釈法によるエンロフロキサシン(ERFX)及び微量液体希釈法によるシプロフロ

キサシン(CPFX)のMICと今回測定したLVFXのMICについて、相関係数(スピアマン)、感度及び特異度を計算し、相関性について検討した。

- (3) 家畜由来の薬剤耐性及び耐性遺伝子が、食品を介してヒトの健康へ悪影響を与える可能性とその程度を科学的に評価するため、フードチェーンにおける情報の収集が重要な課題である。このため、肉養鶏から鶏肉処理過程での薬剤耐性菌の伝播状況を明らかにする必要がある。①肉養鶏生産農場におけるセファロスポリン耐性菌の浸潤状況を定量的に調査し、②食肉処理過程での耐性菌の伝播の程度を調査する。ヒト、食品、家畜から分離される腸内細菌(大腸菌、サルモネラ、カンピロバクター、VREなど)に関して薬剤耐性状況を調査するとともに、分離菌について分子生物学的手法等(薬剤感受性試験、耐性遺伝子型別及びPFGE法による遺伝子型別)を用いて比較解析し、耐性菌あるいは耐性遺伝子の伝播経路を解明する。
- (4) 国内で市販される国産鶏肉及び輸入鶏肉を供試検体とし、ESBL産生大腸菌、VREを分離する。なお、供試検体は、地域的なバイアスがかからないように配慮し、多系列の複数店舗から購入し、産地(都道府県)が特定されている若鶏もも肉に限定した。ESBL産生確認のためにCTX、CAV、CAZディスク、AmpC産生確認のためにCTX、ボロン酸、CAZディスクをそれぞれ用いたディスク拡散法(DDST)を行った。CTXに対してR(耐性)またはI(中間)であった株についてAmpC/ESBL鑑別ディスク(関東化学)を用いてESBL産生菌およびAmpC産生菌のスクリーニング試験を行った。各々の耐性遺伝子型(ESBL; TEM, SHV, CTX-M, および AmpC; MOX, CIT, DHA, ACC, EBM, FOX)の確認には各種特異的プライマーを用いたPCR法を用いた。
- (5) VREの検出：培地；腸球菌分離にはEnterococcusel Broth (BBL)、Bile Esculin Azide agar (Difco) および Brain Heart Infusion agar (Difco) を使用。用いた薬剤；バンコマイシン(VCM)、テイコプラニン(TEIC)腸球菌の分離；VRE検出のための選択的方法を用いた。VREの検出にはvanA, vanB, vanC1, vanC2/3, vanN, 各種ddlの特異的プライマーを用いたマルチプレックスPCR法を用いた。必要に応じてDNAシーケンス解析(Big Dye primer法)、PFGE解析、MLST解析を行った。
- (6) 薬剤の最少発育阻止濃度(以下MIC)は、

Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) 法に準拠したドライプレート‘栄研’ (栄研化学、栃木) を用いた微量液体希釈法、あるいは CLSI の方法に従い、センシディスク (BD) を用いた KB 法で薬剤感受性を調べた。により決定した。供試薬剤は、アンピシリン (ABPC)、CEZ、セフトキシム (CTX)、メロペネム (MEPM)、ゲンタマイシン (GM)、カナマイシン (KM)、テトラサイクリン (TC)、ナリジクス酸 (NA)、シプロフロキサシン (CPFX)、コリスチン (CL)、クロラムフェニコール (CP)、トリメトプリム・スルファメトキサゾール (ST) の 12 剤を用いた。必要に応じ、ストレプトマイシン (SM)、ノルフロキサシン (NFLX)、オフロキサシン (OFLX)、スルフィソキサゾール (Su)、ホスホマイシン (FOM)、アミカシン (AMK)、イムペネム (IPM) を加えた。

- (7) 健康者から分離された大腸菌の薬剤耐性菌出現状況: 2015 年 6 月～12 月に当センターに搬入された健康者成人 297 名の糞便から分離された大腸菌 297 株を供試した。これらの菌株を対象に上記 17 薬剤に対する耐性率を調べた。
- (8) 地研で保有・保管している薬剤耐性菌を含む細菌株について: 薬剤耐性菌検査を実施している地研を対象に、感染症法等で規定される薬剤耐性菌株、及び食中毒・感染性胃腸炎起因菌株 (薬剤耐性菌株を含む) の保有・保管数について調査した。

C. 研究結果:

- (1) 2015 年 11 月 23-24 日開催された WHO AMR-TAG の会議に出席した。WHO の global action plan への各国の対応状況に関して話し合われた。そこで、新情報としてカルバペネム耐性菌への治療薬であるコリスチンに対する耐性菌が、中国で高頻度に出現してしまっていることが報告された。当該研究班でも調査して行くことにした。
- (2) 国内のブロイラーから分離される大腸菌やサルモネラにおいて、第 3 世代セファロスポリン耐性が 2004 年ごろから顕著に増加した。諸外国でも同様な傾向が認められる中、カナダで実施した調査において、ワクチンを卵内接種する時にセフトオフル (動物用第 3 世代セファロスポリン製剤) を混合することが要因として指摘された。国内においても生産者団体が養鶏にセフトオフルを使用することを自主的に禁止した結果、農場の鶏糞からの ESBL/AmpC 産生大腸菌の検出が減少したが、

市販鶏肉から第 3 世代セファロスポリン耐性菌は依然として分離された。この差がどこから来るのかは今後の調査対象である (図 2)。

国内で市販される国産鶏肉及び輸入鶏肉 50 検体を供試検体とし、ESBL 産生大腸菌又は VRE を検出・分離した。市販鶏肉 50 検体における ESBL 産生大腸菌の陽性率は、全体で 76.0% (陽性検体数=38) であり、国産・輸入鶏肉の別ではほぼ同等の陽性率を示した。ESBL 産生大腸菌は計 45 株分離され、国産鶏肉由来株では blaCTX-M-1 及び blaCTX-M-15 の両遺伝子を保有する割合が 42.4% であり、輸入鶏肉由来株に比べ、高い傾向であった。一方、輸入鶏肉由来株では、blaCTX-M-2 遺伝子を保有する割合が 50.5% と高い傾向であった。blaCTX-M-1 及び blaCTX-M-15 を併せ持つ分離菌株では、IncII プラスミドが 73.3% の割合で認められ、これらの関連性と共に接合伝達性プラスミドである可能性が示唆された。 β ラクタム系以外の薬剤に対する感受性を調べたところ、テトラサイクリン耐性が 81.6% と最も多く、続いてカナマイシン耐性 (63.2%)、ストレプトマイシン耐性 (55.3%) であった。フルオロキノロン系薬剤であるシプロフロキサシンでは、28.9% と比較的高い割合で耐性が認められた。これらの菌株の諸性状を比較したところ、購入店別または産地別による偏りは認められなかった。市販鶏肉 17 検体における VRE の陽性率は、全体で 63.6% (陽性検体数=7) であり、国産・輸入鶏肉の別ではほぼ同等の陽性率を示した (国産鶏肉 63.6% および輸入鶏肉 66.7%、有意差なし [$P>0.05$])。VRE は計 22 株分離され、ほとんどが *E. gallinarum* であり、vanC1 遺伝子を保有していた。ESBL 産生株、AmpC 産生株 (合計 169 株) の菌種としては *Escherichia coli* が最多であり (153 株 91%)、次いで *Klebsiella pneumoniae* (7 株 4%)、*Citrobacter freundii* (4 株 2%) が多く分離された。健康な成人 297 人の糞便から分離された大腸菌 297 株を対象に薬剤感受性試験を実施した。ESBL 産生株が疑われる株が 24 株 (8.1%) 認められた。AMK、IPM、MEPM に対する耐性菌は認められなかった。

別の調査では、2014 年 2 月に収集した食肉 (鶏肉) 189 検体のうち、輸入鶏肉 1 検体 (ブラジル産) から VanA 型 VRE (*E. faecium*) 株が検出された (1.6%)。一方、国内産鶏肉 2 検体から VanN 型 VRE 株が検出され (2/60

検体：検出率 3.3%)、それらは全て *E. faecium* 株であった。

- (3) 食品およびヒト由来サルモネラの解析。食品由来株は 15 種類の血清型に、ヒト由来株は 36 種類の血清型に分類された。食品およびヒト由来株のいずれも、KM, SM, TC, Su の 4 薬剤の耐性が多かった。食品とヒト由来株の両方で多く検出される血清型は 07 群 *Infantis*, 04 群 *Schwarzengrund*, 04 群 *Agona* の 3 血清型であった。それぞれの耐性率を比較すると、*Infantis* では食品由来 90.7%, ヒト由来 82.4%, *Schwarzengrund* では食品由来 91.7%, ヒト由来 100%, *Agona* では食品由来 100%, ヒト由来 80% と共に薬剤耐性率は高かった。一方、CPFX, NFLX, AMK, IPM, MEPM に対する耐性株は認められなかった。

- (4) 2015 年 5 月に WHO は薬剤耐性に関する Global Action Plan を採択し、取り組むべき課題の一つとして Global surveillance があげられた。GLASS は人の検体を対象とし、血液由来の大腸菌、*Klebsiella pneumoniae*、*Acinetobacter baumannii*、黄色ブドウ球菌、肺炎球菌、サルモネラ、尿由来の大腸菌、*K. pneumoniae*、便由来のサルモネラ、赤痢菌、尿路、膣由来の淋菌を対象として各国からデータを収集することとされている。日本では、JANIS 検査部門で臨床的に重要な菌種について全検体のデータをまとめて集計している。大腸菌のイミペネム、メロペネム耐性は 1% 未満、レボフロキサシン耐性は 35.5%、セフトキシム耐性は 17.8% だった。*K. pneumoniae* では、イミペネム、メロペネム耐性は 1% 未満、レボフロキサシン耐性は 2.5%、セフトキシム耐性は 5.1% だった。GLASS は食品由来株の調査については触れていないが、昨今食品由来の菌株の薬剤耐性率が非常に高いことが報告されていることから、今後国としてのデータを整備し、さらに人由来菌や家畜由来菌と比較できるようにすることが重要になってくる。食品では地方衛生研究所がサルモネラ、EHEC、キャンピロバクターなどを分離培養し、薬剤感受性試験を実施しているが、現在は各所がそれぞれに集計して公表している。各地方衛生研究所で標準化された収集方法や集計法を作成し、データを集積していく必要があると考えられる。

- (5) 平成 26 年度に家畜から分離された大腸菌について、アンチバイオグラムを作成するとともに、平成 15 年度から平成 25 年度までのア

ンチバイオグラムを動物医薬品検査所 HP (http://www.maff.go.jp/nval/yakuzai/yakuzai_p3-1.html) に掲載した。JVARM の農場由来の大腸菌については、アンチバイオグラムの作成及び公表を継続的に実施する(図 2)。

- (6) JANIS と JVARM での測定薬剤の関連の確認(第 3 世代セファロスポリン系)：

CTX の MIC に対する、CTF の MIC との相関係数、感度、特異度はそれぞれ 0.764、0.98、1.00 であった。また、LVFX の MIC に対する、ERFX 及び CPFY の相関係数、感度、特異度はそれぞれ 0.763、1、0.899 及び 0.929、1、0.980 であった。相互比較が可能であった(図 2)。

- (7) 健康者から分離された大腸菌の薬剤耐性菌出現状況：

健康者糞便 297 名から分離された大腸菌 297 株について薬剤感受性試験を実施した結果、1 薬剤以上に耐性を示した菌株は 137 株(46.1%)であった。薬剤別耐性率をみると、最も耐性率が高か

ったのは APBC で 30%、次いで NA (24.6%)、Su (22.2%)、TC (21.2%)、SM (17.8%)、ST (14.4%)、CPFX (11.1%)、NFLX (10.4%)、CTX (8.1%)、CP (7.7%)、KM (6.7%)、GM (5.1%)、FOM (0.7%) の順で、AMK、IPM、MEPM は全て感受性であった。

- (8) 健康サルモネラ保菌者：

業務従事者の検便における NTS 陽性率についての情報を得た。2011 年から 2014 年において、約 0.06% から 0.09% 程度であった。また、NTS 全体における薬剤耐性株の頻度は、ST 合剤に対する耐性が約 11%、AMPC 耐性 6%、ミノサイクリン耐性 4-5%、セファロスポリン耐性 3-4%、フルオロキノロン耐性が 1% 未満であった。

- (9) 地研における薬剤耐性菌検査の実施状況：

アンケート回答 75 地研のうち、何らかの薬剤耐性菌検査を実施していると回答した地研は 59 (78.7%) で、8 割近い地研が同検査を実施していることが判明した。サルモネラでは 59 地研中の 31 地研と 22 地研がそれぞれヒト由来株、食品由来株の耐性検査を実施している。同様に、EHEC (ヒト 36、食品 17)、EHEC 以外の病原大腸菌 (21、13)、非病原大腸菌 (20、14)、キャンピロバクター (26、23) で、相当数の地研が薬剤耐性菌検査を実施していることが判明した。一方、EHEC 以外の三類感染症起因菌では、ヒト由来株が主で食品由来株の検査を実施している地研は少数であった。

3年間の検査総数において、食品由来菌の陽性（耐性）率（68.0%）がヒト由来菌の陽性率（43.6%）よりも高い傾向が認められた。基質特異性拡張型β-ラクタマーゼ産生菌（ESBL）及びAmpC型β-ラクタマーゼ産生菌については、サルモネラ（食品由来）と非病原大腸菌（ヒト由来及び食品由来）で多数検出されたが、カンピロバクターでは全く検出されていない。20地研以上で11薬剤（ABPC, CTX, GM, KM, SM, TC, NA, ST, CP, FOM, CPM）について感受性試験が実施され、詳細に調べられていることが判明した。

薬剤耐性菌検査の費用を拠出する予算別（実施形態）については、行政検査41地研、依頼検査11地研、研究的取組み45地研、その他4地研であった。検査方法としては、感受性試験や遺伝子解析等、全ての検査方法を含んでいる。ヒトや食品由来の食中毒・感染性胃腸炎起因菌については、主として研究的取組み、特に地研の内部研究費（自治体予算）によって実施されていることが明らかにされた。

(10) 地研で保有・保管している薬剤耐性菌株を含む細菌株について

サルモネラについては、45地研がヒト由来株を100株以上（うち12地研は耐性菌株を100株以上）保有し、20地研が食品由来株を100株以上（うち7地研は耐性菌を100株以上）保有していた。全国の地研で保有・保管されている菌株数は、サルモネラでは、ヒト由来株5300(1800)、食品由来株3300(1150)（括弧内は耐性菌数）が保有・保管されていた。同様に、EHECでは、ヒト由来株5900(2150)、食品由来株900(250)、カンピロバクターでは、ヒト由来株4850(1850)、食品由来株2900(1300)が保有・保管されていることが推定された。

D. 考察

WHOは2015年5月の総会にGlobal action plan on AMRを提出し、各国に2年以内にNational action planを作成するように求めた。”One health“に基づいた対策を立てることを要求している。わが国も、2016年3月までに作成し、公開する予定である。その中でサーベイランスについては、農業、畜産、食品、ヒトの領域をカバーするようなサーベイランス体制の構築を掲げている。まさしく、われわれの研究班が目指してきたところであり、ようやく国もその方針を掲げるようになったことは研究班の本望とするところである。

“One Health”的アプローチとして、まずは

今まで別個に行われてきた家畜等の耐性菌モニタリング体制JVARMとヒトの院内感染耐性菌サーベイランスJANISで得られたデータが同じ土俵で比較解析できるかどうかを見た。その結果、今まで使用されていた薬剤や測定方法に互換性があるとの解析結果であったので、JVARMのデータをJANISプログラムに編入させることにより同一の表の上に耐性率の動向をプロットして比較できるようになった（図2）。その比較から、ヒト由来大腸菌のニューキノロン耐性率は2013年度には約35%に達し、この10年で3倍にも増加してきていたが、肉用鶏、採卵鶏、肉用牛、豚らの畜産由来大腸菌の耐性率はこの10年間で、10%以内で経緯していた。家畜の大腸菌とヒトの大腸菌は遺伝学的に異なること、ニューキノロン耐性は染色体の点変異であることを考えると、家畜とヒトの耐性大腸菌は独立に進化しており、それぞれの環境内での薬剤による選択圧の結果を示していると考えられる。ヒトの耐性率が高くなってきているのは、ヒトでのニューキノロンの使用頻度がこの10年で増加していることを反映していると考えるのが妥当であろう。今後実際に投与されている抗菌薬の年次ごとの量との比較が重要になる。

一方、第3世代のセファロスポリン系薬剤については、ヒトでは年々耐性率が増加し、2013年には20%近くまでになっていた。家畜では肉用鶏からの分離率が高く、2010年までは10~15%を占めていたが、2010年以降急激に減少し、2013年には2%前後までになっていた。肉用鶏における減少は、農家がセフトオフルの鶏への投与を自主的に中止した時期と一致しており、選択圧が取り除かれた影響と考えられた。同じようなことがカナダにおいても報告されているのでその解釈が妥当であろう。

ヒトにおいて年々耐性率が増加しているのは、ヒトにおけるセファロスポリン系薬の使用頻度が依然として高いことを反映しているのであろう。ただ、CTX耐性遺伝子は不活化酵素の遺伝子で動く遺伝子群として存在しているものであるから、もともとはヒトの大腸菌が持っていたものではなく、動物等の腸内細菌群に入り込んでいた遺伝子が食を介してヒトの大腸菌に移動してきたと考えるられる。事実、肉用鶏の大腸菌の耐性遺伝子とヒトの耐性遺伝子は遺伝学的に同一であり、動く遺伝子群として存在している。ヒトの大腸菌に入り込んだ耐性遺伝子は、選択圧が続く限り、増加し続けるであろう。

JVARMでは、家畜由来の大腸菌、サルモネラ、カンピロバクター等の腸内細菌の耐性データを収集できる。一方、JANISは病院内感染に由来

する病原体の耐性菌のデータが主であるので、呼吸器系細菌や泌尿器系細菌が主であり、サルモネラ、カンピロバクター、下痢原性腸内細菌のデータの収集が少ない。そこを補うためには、感染症法による感染症発生動向調査（病原体サーベイランスを含む）、食品衛生法による食中毒起因菌の検査を担当している地方衛生研究所（地研）のデータを取り込む必要がある。今回、地研における耐性菌検査の実態把握を行った。その結果、75 地研中の 59 地研（78.7%）が何らかの薬剤耐性検査を実施していることが判明し、そのうち 26～36 地研がサルモネラ、EHEC、カンピロバクターヒト由来株の耐性検査を、17～23 地研がそれらの食品由来株の耐性検査を、それぞれ実施していることが明らかにされた。薬剤耐性検査件数についても、食中毒・感染性胃腸炎起因菌のヒト由来株については約 10,000 件、同食品由来株については約 3,000 件の耐性検査が 3 年間で実施されていた。また、全国の地研で保有・保管されている食品由来薬剤耐性菌株は 3,500 株以上であることがわかった。これらの結果から、地研において食品由来菌の薬剤耐性検査が相当な規模で実施されているので、今後これらのデータを JVRAM-JANIS のシステムの中に取り込む体制の構築を行い、One-health での対応を確立する予定である。

今回の調査で、健康者糞便由来の大腸菌 297 株について薬剤感受性試験を実施した結果、供試した薬剤に 1 薬剤以上耐性を示した株の割合は 46.1%であった。CTX 耐性株は 8.1%、CPFIX 耐性は 11.1%であることがわかり、健康人の大腸菌の中に耐性菌がかなり存在することは、薬剤による選択圧というよりも、食品を通して耐性菌や耐性遺伝子が入り込んでいることを示すものであろう。今後、これらの株については、ESBL 産生菌あるいは AmpC 産生菌の確認を行う予定である。

食品およびヒト糞便由来サルモネラの薬剤耐性率は、食品由来が 90.5%、ヒト由来が 39.2%であった。食品由来株の多くは鶏肉および鶏内臓肉由来である。薬剤別耐性率も、食品由来とヒト由来で同じような傾向を示すことから、お互いの関連性が疑われた。

E. 結論

JVARM と JANIS で得られてデータの相互比較が可能となった。その結果、JVARM と JANIS で測定薬剤の異なるフルオロキノロン系抗菌剤及び第 3 世代セファロスポリンについて、いずれの薬剤においても高い相関が認められたことから、上述したヒト臨床分離株と家畜由来株

の耐性率の推移の違いは、測定薬剤が異なることが影響しているのではなく、薬剤耐性率の推移の違いを反映していることが確認された。フルオロキノロン耐性大腸菌は、家畜およびヒトではそれぞれ独立に耐性菌が進化しており、耐性菌の頻度は薬剤の選択圧の影響を受けていると考えられた。今後は、それぞれにおいての実際の薬剤使用量と耐性率との相関を見る必要がある。第 3 世代セファロスポリンに対しても、ヒト臨床分離株では継続的な耐性率の上昇（約 15%/10 年）が認められたが、家畜由来株においては 2003 年～2009 年に肉用鶏では上昇が認められたが、2010 年以降耐性率が急激に低下した。その原因として農家がセフトオフルの鶏への投与を自主的に中止した時期と一致しており、選択圧が取り除かれた影響と考えられた。ヒトにおいて耐性率が依然として増加傾向にあるのは、やはり選択圧がかかっているためなのか、今後使用量との関係をつめる必要がある。

地方衛生研究所におけるヒト及び食品由来菌の薬剤耐性検査の実態調査を行い、全国におけるこれらの菌株を対象とする薬剤耐性検査の実施地研数、耐性検査件数、耐性菌株の保有・保管数、耐性検査の実施形態が初めて明らかにされ、地研において食品由来菌の薬剤耐性検査が相当な規模で実施されていることが判明した。これらのデータは、環境—動物—食品—ヒトを包括するワンヘルス・アプローチにおいて重要であり、JANIS、JVARM とあわせ三者のデータを統合するシステムの開発が必要である。

F. 知的財産権の出願・登録状況 なし

G. 健康危険情報

家畜環境中の多剤耐性菌が食肉を介してヒトに伝播する可能性が示唆され、食肉（生肉）の取り扱いには注意が必要である。ヒト健康人の糞便からも多剤耐性菌がかなり検出されるので、それを介しての耐性菌の伝播も考えていく必要がある。

H. 研究発表

1. 論文発表

(1) 国内

- 1) 四宮博人, 勢戸和子, 川瀬 遵, 有川健太郎, 船渡川圭次, 鈴木匡弘, 久保田寛頭, 調 恒明: 地方衛生研究所における細菌学的検査・研究の最新事情. 日本細菌学雑誌 70(2):309-318, 2015.

2) 菅 美樹、四宮博人、北尾孝司：市販鶏レバーおよび臨床材料から分離した基質特異性拡張型 β -ラクタマーゼ産生 *Escherichia coli* および *Klebsiella pneumoniae* が保有する $\text{bla}_{\text{CTX-M}}$ 型別に関する検討。感染症学雑誌 印刷中

(2) 海外

- 1) Hiki M, Kawanishi M, Abo H, Kojima A, Koike R, Hamamoto S, Asai T. Decreased Resistance to Broad-Spectrum Cephalosporin in *Escherichia coli* from Healthy Broilers at Farms in Japan After Voluntary Withdrawal of Ceftiofur. *Foodborne Pathog Dis.* 2015;12:639-43.
 - 2) Makita M, Goto M, Ozawa M, Kawanishi M, Koike M, Asai T, Tamura Y. Multivariable Analysis of the Association Between Antimicrobial Use and Antimicrobial Resistance in *Escherichia coli* Isolated from Apparently Healthy Pigs in Japan. *Microb Drug res.* 2015
2. 学会発表
- (1) 国内
- 1) 山本詩織、朝倉 宏、岡田由美子、吉田麻利江、五十君静信：国内の市販鶏肉におけるESBL産生大腸菌の分布状況と保有プラスミドの諸性状について、第89回日本細菌学会総会、2016年3月、大阪
 - 2) 野村隆浩、谷本弘一、久留島潤、柴山恵吾、渡邊治雄、富田治芳。日本で新たに分離されたVanN VREの解析。第88回日本細菌学会総会。2015年3月27日 岐阜。
 - 3) 野村隆浩、谷本弘一、富田治芳。新たに日本で分離されたVanN型VREについて。第26回日本臨生微生物学会。2015年2月1日 東京。
 - 4) 千葉菜穂子、谷本弘一、野村隆浩、富田治芳。ESBL/AmpC産生腸内細菌科細菌の鶏肉からの分離。第44回薬剤耐性菌研究会。2015年10月30日 仙台。
 - 5) 浅井鉄夫 野生動物および家畜環境中の耐性菌 第30回日本微生物生態学会（土浦、2015）
 - 6) 鈴木香澄、浅井鉄夫 肉養鶏の発育段階における第3世代セファロsporin耐性菌の推移 第89回日本細菌学会総会（大阪、2016）

(発表予定)

- 7) 西野由香里、下島優香子、井田美樹、石塚理恵、黒田寿美代、吉原祥子、甲斐明美、平井昭彦、貞升健志：鶏肉由来大腸菌の薬剤感受性、第36回日本食品微生物学会学術総会、2015年11月、川崎市
- 8) 仙波敬子、園部祥代、木村俊哉、大倉敏裕、烏谷竜哉、四宮博人：地研における薬剤耐性菌解析の取り組み、衛生微生物技術協議会第36回研究会、2015. 7. 23-24、仙台
- 9) 木村千鶴子、仙波敬子、園部祥代、木村俊也、四宮博人：小児感染性胃腸炎患者から分離された腸管凝集集着性大腸菌の性状について、第68回日本細菌学会中国・四国支部総会、2105.10.3-4、岡山
- 10) Keiko Semba, Mayumi Yamashita, Sachiko Sonobe, Eiji Yokoyama, Tsuyoshi Sekizuka, Komei Shirabe, Makoto Kuroda, and Hiroto Shinomiya: Whole genome analysis of *Salmonella* isolates from foods and patients reveals their detailed relationships. シンポジウム7「ゲノム解析手法の最前線」、第89回日本細菌学会総会、2016.3.23-25、大阪（予定）
- 11) 川西路子、比企 基高、阿保 均、小澤 真名緒、小池 良治、濱本 修一、柴山恵吾、鈴木里和。院内感染対策サーベイランス（JANIS）と家畜由来細菌の薬剤耐性モニタリング（JVARM）の連携について、第158回日本獣医学会学術集会2015
- 12) 比企 基高、清水裕仁、川西路子、阿保 均、小澤 真名緒、小池 良治、濱本 修一。家畜由来大腸菌におけるセフトロフルと人用の各種第3世代セファロsporinとの最小発育阻止濃度（MIC）の関係。第158回日本獣医学会学術集会、2015年9月8日 青森
- 13) 渡邊治雄。食品媒介性感染症の最近の動向。第36回日本食品微生物学会学術総会。2015.11. 川崎市
- 14) 渡邊治雄。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。平成27年度厚生労働科学研究シンポジウム。2016.2. 東京

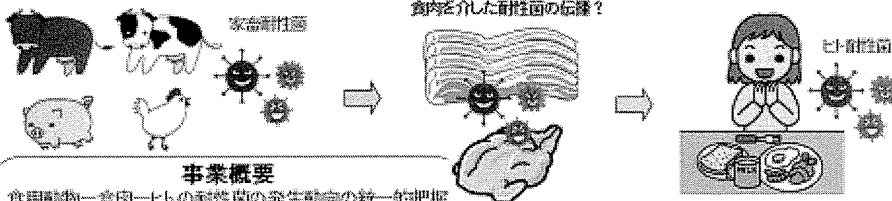
図1. 研究課題(渡邊治雄): 食品由来薬剤耐性菌の発生動向及び衛生対策に関する研究

社会的背景-WHO等の行動

- 1) 多剤薬剤耐性菌による感染症が世界的な問題
- 2) "One Health"に基づいた耐性菌対策
- 3) AMR National action planの作成、実行

我が国の対策

- 1) 耐性菌の重要性の認識、啓発
- 2) サーベイランスの強化
- 3) 効果的な感染防止対策の実施
- 4) 動物、ヒトにおける抗菌薬の適正使用
- 5) 迅速診断法、新薬、ワクチン等の開発
- 6) 国際協力



事業概要

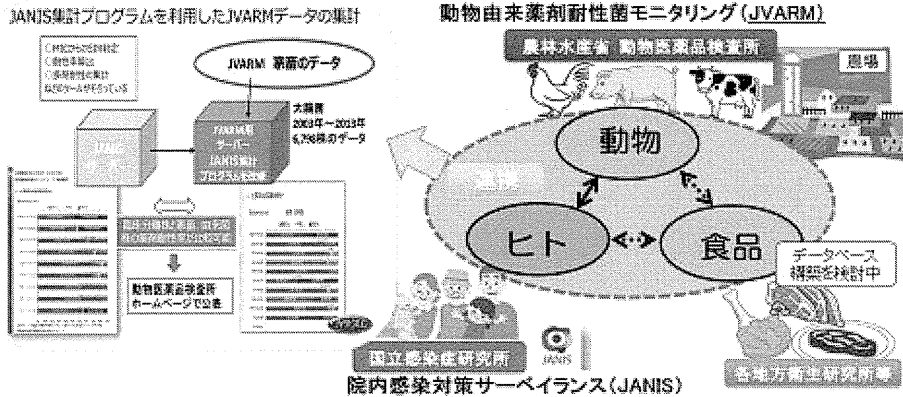
食用動物-食肉-ヒトの耐性菌の発生動向の統一的把握

- 1) 食用動物、ヒトから分離される耐性菌の現状把握(サーベイランスの強化); JVARMとJANISの統合の改良と維持
- 2) 食肉由来耐性菌情報の統合(地方衛生研究所等で行われている食品調査データの統合)
- 3) 動物、食肉、ヒト由来耐性菌および耐性遺伝子の比較解析
- 4) 解析結果、耐性菌の情報発信と啓発

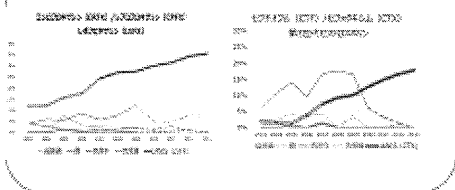
期待される成果

- 1) 動物、食品、ヒトの薬剤耐性菌分離状況の把握
- 2) 食用動物-食肉を介した耐性菌のヒトへの伝播、拡散の制御
- 3) 食肉由来菌と臨床分離菌との因果関係の解明
- 4) 抗菌薬適正使用のための科学的根拠

図2. 今年度(平成27年度)の成果 薬剤耐性サーベイランス体制



E. coli 耐性率推移の比較



JVARMとJANISで測定された耐性率も、感度、特異度いずれも1に近い値が得られたため、推移の比較が可能

薬剤耐性率	AMP	TET	CHL	COL	GEN	CIP	FLO	SXT	MDR
動物	10.0	15.0	20.0	25.0	30.0	35.0	40.0	45.0	50.0
ヒト	12.0	18.0	22.0	28.0	32.0	38.0	42.0	48.0	52.0
食品	11.0	16.0	21.0	26.0	31.0	36.0	41.0	46.0	51.0

平成27年度食品の安全確保推進研究事業

「食品由来薬剤耐性菌の発生動向及び衛生対策に関する研究」

分担課題名：家畜由来腸内細菌の疫学的研究：JVARMとJANISの連携について

分担研究者：川西 路子（農林水産省動物医薬品検査所）

研究協力者：小池 良治（農林水産省動物医薬品検査所）

研究協力者：小澤 真名緒（農林水産省動物医薬品検査所）

研究協力者：内山 万利子（農林水産省動物医薬品検査所）

研究協力者：比企 基高（農林水産省消費・安全局）

研究協力者：鈴木 里和（国立感染症研究所）

研究協力者：柴山 恵吾（国立感染症研究所）

研究要旨

本研究では、WHOのglobal action planにおいて提唱されている動物、食品、ヒト由来細菌の統合された薬剤耐性の状況サーベイランスの構築のため、JANIS（Japan Nosocomial Infections Surveillance）とJVARM（Japanese Veterinary Antimicrobial Resistant Monitoring System）のデータの統合の確立に向け、JVARMデータの整備作業を継続した。平成26年度に分離された大腸菌について、今年度新規にアンチバイオグラムを作成し、昨年度の事業で作成した平成15年度から平成25年度までのアンチバイオグラムとあわせて動物医薬品検査所HP

(http://www.maff.go.jp/nval/yakuzai/yakuzai_p3-1.html)に掲載した。また、JANISとJVARMでの測定薬剤のうち医療上重要とされる第3世代セファロsporin及びフルオロキノロン系抗菌剤について、薬剤感受性の相関を確認した。その結果いずれの薬剤においても相関係数、感度、特異度は1に近い値を示しており、CTFのMICはCTXのMICと、ERFX及びCPFXのMICはLVFXのMICとの比較がそれぞれ可能と考えられた。

A. 研究目的

家畜に由来する薬剤耐性菌が畜産食品を介して人に伝播し、人の健康に危害を与える可能性について評価するため、国内では動物由来薬剤耐性菌モニタリング（JVARM）が構築されている。

一方、医療の分野においては、医療機関における院内感染の発生状況、薬剤耐性菌の分離状況および薬剤耐性菌による感染症の発生状況を調査することで、我が国の院内感染の概況を把握し、医療現場への院内感染対策に有用な情報の還元等を行うことを目的に、院内感染対策サーベイランス（JANIS）が構築されている。

本研究では、WHOのglobal action planにおいて提唱されている動物、食品、ヒト由来細菌の統合された薬剤耐性サーベイランスの構築のため、JANISとJVARMのデータの統合の確立に向け、JVARMデータの整備作業を継続した。

また、JVARMとJANISでは測定薬剤が一部異なるため、JVARMとJANISのデータを比較可能か検討するため、医療上重要とされる第3世代セファロsporin及びフルオロキノロン系抗菌剤について、各薬剤間の薬剤感受性の相関を確認することとした。

B. 研究方法

(1)平成 26 年度家畜由来大腸菌のアンチバイオグラムの作成

昨年度 JVARM の大腸菌のアンチバイオグラムを作成するために活用した JANIS 集計用プログラムを一部改変し移植した JVARM データサーバーに、平成 26 年度に分離された JVARM の大腸菌のデータを加工・入力し、アンチバイオグラムを作成した。

(2) JANIS と JVARM での測定薬剤の相関の確認 (第 3 世代セファロスポリン系)

JVARM で 2010 年から 2013 年に収集した 118 株について、セフトフル (CTF) に対する MIC 値を寒天平板希釈法により測定した。

既に JVARM で測定した微量液体希釈のセフトキシム (CTX) の MIC と今回測定した CTX の MIC について、相関係数 (スピアマン)、感度及び特異度を計算し、相関性について検討した。

(3) JANIS と JVARM での測定薬剤の相関の確認 (フルオロキノロン系抗菌剤)

JVARM で 2009 年に収集した 113 株のレボフロキサシン (LVFX) に対する MIC 値を微量液体希釈により測定した。

既に JVARM で測定した寒天平板希釈法によるエンロフロキサシン (ERFX) 及び微量液体希釈法によるシプロフロキサシン (CPFX) の MIC と今回測定した LVFX の MIC について、相関係数 (スピアマン)、感度及び特異度を計算し、相関性について検討した。

C. 研究結果

(1) 平成 26 年度家畜由来大腸菌のアンチバイオグラムの作成

平成 26 年度に分離された大腸菌について、アンチバイオグラム (図 1) を作成するとともに、昨年度作成した平成 15 年度から平成 26 年度までのアンチバイオグラムを動物医薬品検査所 HP

(http://www.maff.go.jp/nval/yakuzai/yakuzai_p3-1.html) に掲載した。

(2) JANIS と JVARM での測定薬剤の相関の確認 (第 3 世代セファロスポリン系)

CTX の MIC に対する、CTF の MIC との相関係数、感度、特異度はそれぞれ 0.764、0.98、1.00.であった (図 2)。

(3) JANIS と JVARM での測定薬剤の相関の確認 (フルオロキノロン系抗菌剤)

LVFX の MIC に対する、ERFX 及び CPFX の相関係数、感度、特異度はそれぞれ 0.763、1、0.899 及び 0.929、1、0.980 であった (図 3、図 4)。

D. 考察

平成 26 年度に分離された JVARM の大腸菌についてもアンチバイオグラムを作成し、平成 15 年度から平成 26 年度までのアンチバイオグラムを動物医薬品検査所 HP 掲載した。このように JVRAM と JANIS の比較可能なデータを公表し、両者の連携を継続的に実施した。

JANIS では平成 27 年度にアンチバイオグラムを作成するための SIR の基準値が CLSI2007 から CLSI2012 に変更された。現在 JANIS では CLSI2007 と CLSI2012 の基準の SIR に基づくアンチバイオグラムが並列で公表されている。来年度以降 JVARM のアンチバイオグラム作成において、JANIS のプログラムの修正と同様に SIR 基準を CLSI2012 へ修正をする必要があると考える。

なお、JVARM では平成 24 年度から、と畜場由来株についても実施している。平成 28 年度以降健康家畜由来のモニタリングについては農場由来株を廃止し、と畜場由来株のみとすることから、と畜場由来株のアンチバイオグラムの作成を実施する必要がある。

JANIS と JVARM での測定薬剤の薬剤感受性の相関を確認した結果、第 3 世代セファロスポリンについては、CTX と CTF の相関に問題は無く、フルオロキノロン系薬剤については、CPFX のほうが ERFX よりも LVFX との相関性が高かった。しかし、いずれの薬剤においても相関係数、感度、特異度は 1 に近い値を示しており、CTF の MIC は CTX の MIC と、ERFX 及び CPFX の MIC は LVFX の MIC との比較

がそれぞれ可能と考えられた。

昨年度の事業で示したよう 2003 年から 2013 年の耐性率の経時的変化において、フルオロキノロン系抗菌剤に対する耐性率は、ヒト臨床分離株では継続的な上昇(約 20%/10 年)が認められたが、家畜由来株において全期間ほぼ 10%以下で継続的な上昇は認められなかった。第 3 世代セファロスポリンに対しても、ヒト臨床分離株では継続的な耐性率の上昇(約 15%/10 年)が認められたが、家畜由来株においては 2003 年以降の肉用鶏では上昇が認められたが、2012 年に耐性率が低下し全期間に渡る継続的な上昇はいずれの家畜においても認められなかった。以上のように、ヒト臨床分離株と家畜由来株の耐性率の推移に明らかな関連は認められなかった。

今回 JVARM と JANIS で測定薬剤の異なるフルオロキノロン系抗菌剤及び第 3 世代セファロスポリンについて、いずれの薬剤においても高い相関が認められたことから、上述したヒト臨床分離株と家畜由来株の耐性率の推移違いは、測定薬剤が異なることが影響しているのでは無く、薬剤耐性率の推移の違いを反映していることが確認された。

E. 結論

平成 26 年度に分離された大腸菌について、アンチバイオグラムを作成し、昨年度の事業で作成した平成 15 年度から平成 25 年度までのアンチバイオグラムと合わせて動物医薬品検査所 HP に掲載した。

フルオロキノロン系及び第 3 世代セファロスポリン系について、JANIS と JVARM での測定薬剤との薬剤感受性に高い相関があることを確認し、両モニタリングで実施された薬剤の耐性率の比較が可能であることを示した。

F. 健康危害情報

なし

G. 研究発表

1.論文発表

- 1) Hiki M, Kawanishi M, Abo H, Kojima A, Koike R, Hamamoto S, Asai T. Decreased Resistance to Broad-Spectrum Cephalosporin in Escherichia coli from Healthy Broilers at Farms in Japan After Voluntary Withdrawal of Cefitiofur. Foodborne Pathog Dis. 2015;12:639-43.
- 2) Makita M, Goto M, Ozawa M, Kawanishi M, Koike M, Asai T, Tamura Y. Multivariable Analysis of the Association Between Antimicrobial Use and Antimicrobial Resistance in Escherichia coli Isolated from Apparently Healthy Pigs in Japan. Microb Drug res. 2015

2.学会発表

- 1) 川西路子、比企 基高、阿保 均、小澤 真名緒、小池 良治、濱本 修一、柴山恵吾、鈴木里和。院内感染対策サーベイランス (JANIS) と家畜由来細菌の薬剤耐性モニタリング (JVARM) の連携について第 158 回日本獣医学会学術集会 2015 年 9 月 8 日 青森
- 2) 比企 基高、清水裕仁、川西路子、阿保 均、小澤 真名緒、小池 良治、濱本 修一。家畜由来大腸菌におけるセフトオフルと人用の各種第 3 世代セファロスポリンとの最小発育阻止濃度 (MIC) の関係 第 158 回日本獣医学会学術集会 2015 年 9 月 8 日 青森

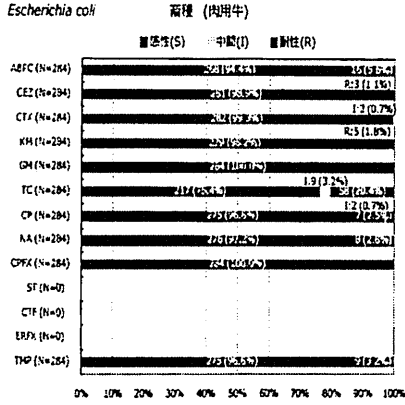
H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

- ※ JVARM事業を通して菌株の提供等ご協力いただきました全国の家畜保健衛生所の諸先生方に深謝いたします。

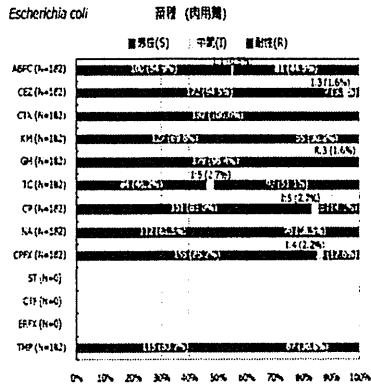
2014年

7. 主要菌の抗菌薬感受性*



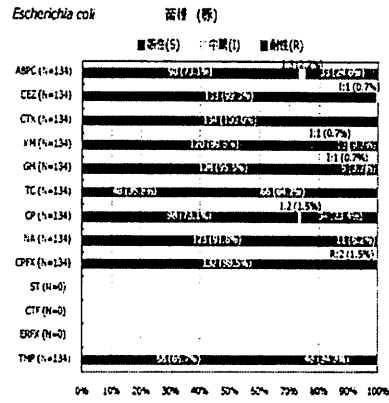
2014年

7. 主要菌の抗菌薬感受性*



2014年

7. 主要菌の抗菌薬感受性*



2014年

7. 主要菌の抗菌薬感受性*

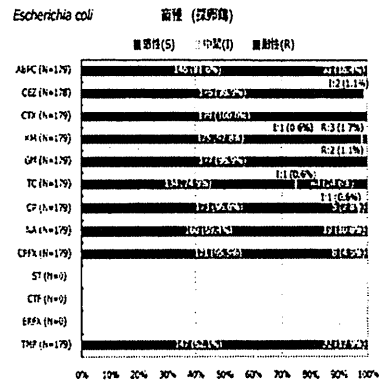


図 1. 2014年 JVARM 家畜由来株のアンチバイオグラム

寒天平板希釈法で測定したCTFのMIC (mg/L)	微量液体希釈法で測定したCTXのMIC (mg/L)									
	≤0.5	1	2	4	8	16	32	64	>64	Total
0.5	4		1							5
1	4									4
2	1	3	4							8
4		1	1	2						4
8				6	7					13
12				8	12	6	1			27
>12				5	13	13	6	12	8	57
Total	9	4	6	21	32	19	7	12	8	118

	CTX感受性	CTX耐性
CTF感受性	19	2
CTF耐性	0	97
Total	19	99

相関係数(スピアマン):0.764
 感度:0.980(97/99)
 特異度:1.00(19/19)

図2. CTF と CTX の MIC の相関

寒天平板希釈法で測定したERFXのMIC (mg/L)	微量液体希釈法で測定したLVFXのMIC (mg/L)										
	0.03	0.06	0.125	0.25	0.5	1	2	4	8	16	Total
0.125	20	5									25
0.25	11	13	5	5	9						43
0.5	3			2	8	1					14
1					4	2					6
2		1		1	2		1				5
4					1		2				3
8											
16								2	1		3
32										1	1
64									1	2	3
Total	34	19	5	8	24	3	3	2	2	3	103

	LVFX感受性	LVFX耐性
ERFX感受性	88	0
ERFX耐性	10	5
Total	98	5

相関係数(スピアマン):0.763
 感度:1(5/5)
 特異度:0.899(88/98)

図3. ERFX と LVFX の MIC の相関

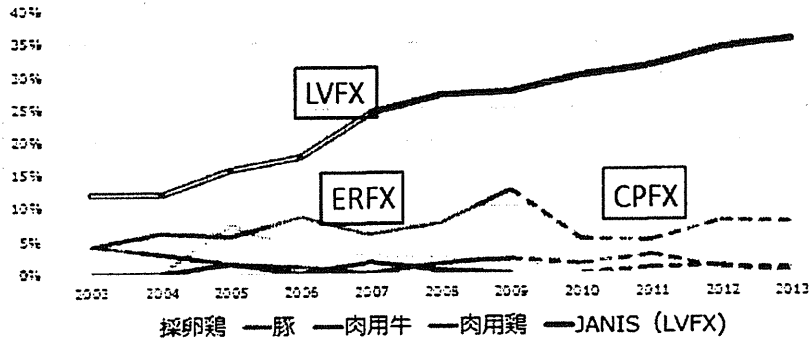
微量液体希釈法で 測定したCPFXの MIC(mg/L)	微量液体希釈法で測定したLVFXのMIC(mg/L)										Total
	0.03	0.06	0.125	0.25	0.5	1	2	4	8	16	
0.03	34	18	2								54
0.06		1	3								4
0.125				5	1						6
0.25				3	18	1					22
0.5					5						5
1						2	1				3
2							2				2
4											
8								2	1	1	4
16									1		1
32										2	2
Total	34	19	5	8	24	3	3	2	2	3	103

	LVFX感受性	LVFX耐性
CPFX感受性	96	0
CPFX耐性	2	5
Total	98	5

相関係数(スピアマン):0.929
 感度:1(5/5)
 特異度:0.980(96/98)

図4. CPFX と LVFX の MIC の相関

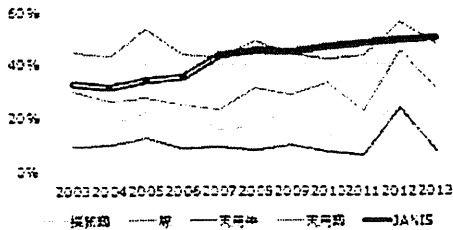
エンロフロキサシン (ERFX) / シプロフロキサシン (CPFX)
レボフロキサシン (LVFX)



- JANIS フルオロキノロン耐性率は10年で約3倍の顕著な増加
- JVARMでは2010年に測定抗菌薬変更となっている
- 肉用鶏由来株が2009年までは増加傾向、その後減少。抗菌薬変更の影響である可能性あり。
- そのほかの畜種由来株は10年間ほぼ横ばい

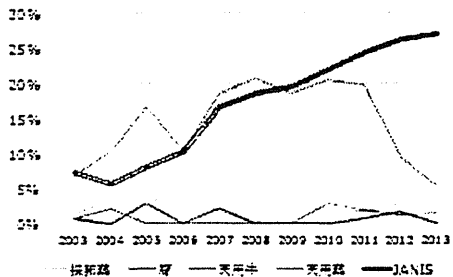
図5. E.coli フルオロキノロン系耐性率の推移

アンピシリン(ABPC) ペニシリン系



- JANIS 特にセファロスポリン耐性が顕著に進行
- JVARM アンピシリン耐性は横ばい〜微増
- セファロスポリン耐性は肉用鶏由来で2010年頃までは急増し、その後急減。そのほかの畜種はほぼ横ばい
- 第1世代Cephは2012年に急落、第3世代Cephは2010年に急落→第3世代Ceph測定薬剤変更の影響が大きい (CTF2/8→CTX8/64)

セファゾリン (CEZ) 第1世代セファロスポリン



セフトリオール (CTF) / セフトキシム (CTX)
第3世代セファロスポリン

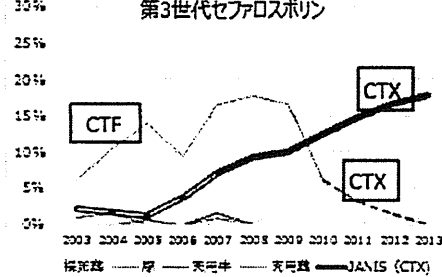


図6. E.coli βラクタム系耐性率の推移

厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）
平成 27 年度 分担研究報告書

食品由来薬剤耐性菌の発生動向及び衛生対策に関する研究
分担課題 家畜に由来する薬剤耐性菌が食品へ伝播する経路に関する研究

研究分担者 浅井 鉄夫（岐阜大学大学院連合獣医学研究科・応用獣医学・教授）
研究協力者 杉山 美千代（岐阜大学大学院連合獣医学研究科）
研究協力者 鈴木 香澄（岐阜大学大学院連合獣医学研究科）

研究要旨

この研究では、肉養鶏農場において発育段階のセファロスポリン耐性菌の分布状況を定量的に調査した。無薬飼育肉養鶏 3 鶏群と有薬飼育肉養鶏 1 鶏群を対象に 2 週間間隔で糞便を採取した。糞便を生理食塩水で希釈し、セファレキシム（第 1 世代セファロスポリン）50mg/L 含有培地と非含有培地を用いてそれぞれの培地で細菌数を測定した。薬剤含有培地から分離した株を同定し、セフトキシム耐性大腸菌の β -lactamase 型を決定した。

大腸菌数は $10^5 \sim 10^8$ CFU/g で、平均 10^6 CFU/g で推移した。セファレキシム耐性菌は、約 2% 未満であった。4 鶏群中無薬飼育と有薬飼育の各 1 鶏群の計 2 鶏群で継続的に耐性菌が分離された。セファレキシム耐性菌のうち、セフトキシム耐性大腸菌は、CMY-2 型と CTX-M 型であった。耐性菌の分布状況は、鶏群により異なることが示唆された。

A. 研究目的

家畜由来の薬剤耐性及び耐性遺伝子が、食品を介してヒトの健康へ悪影響を与える可能性とその程度を科学的に評価するため、フードチェーンにおける情報の収集が重要な課題である。国内のブロイラーから分離される大腸菌やサルモネラにおいて、第 3 世代セファロスポリン耐性が 2004 年ごろから増加した。諸外国でも同様に傾向が認められる中、カナダで実施した調査において、ワクチンを卵内接種する時にセフトフル（動物用第 3 世代セファロスポリン製剤）を混合することが要因として指摘された。わが国において、2012 年にセフトフル（動物専用、第 3 世代セファロスポリン）の卵内接種およびヒナへの使用に対して養鶏団体による自主的注意喚起が行われて以降、農場の鶏糞から ESBL/AmpC 産生大腸菌の出現率が減少した。一方、市販鶏肉から第 3 世代セファロスポリン耐性菌は依然として分離されるため、肉養鶏から鶏肉処理過程での薬剤耐性菌の伝播状況を明らかにする必要がある。本研究は、①肉養鶏生産農場におけるセファロスポリン耐性菌の浸潤状況を定量的に調査し、②食肉処理過程での耐性菌の伝播の程度を明らかにし、③生産から食鳥処理過程での問題を科学的データに基づき提案することを目的とする。

平成 27 年度は、肉養鶏農場において発育段階のセファロスポリン耐性菌の分布状況を定量的に調査した。

B. 研究方法

材料と方法

岐阜県内のブロイラー生産農場で無薬飼育された異なる孵化場から導入した 3 群ブロイラー鶏及び別の農場で抗菌性飼料添加物含有飼料により飼育（有薬飼育）された 1 群を対象にした。飼料添加物の成分と投薬された薬剤及び投薬時期を表 1 に示した。導入から出荷までの期間に、2 週間隔で 3~5 羽の糞便を採取した。

滅菌生理食塩水を用いて、プールした糞便 1g を 10 倍段階希釈し、CEX (Sigma Chemicals, St. Louis, USA) を 50mg/L 添加した DHL 寒天培地（栄研化学、栃木）及び CEX 非添加の DHL 寒天培地に希釈液 50 μ L を接種し、37°C で一晚培養した。CEX 添加及び非添加の DHL 寒天培地に認められた赤色コロニー数を測定し、糞便 1g 中の大腸菌数及び CEX 耐性数を求め、その割合を測定した。コロニーが認められた最高希釈の CEX 添加 DHL 寒天培地から、赤色の 5 コロニーを単離して、TSI 培地及び LIM 培地を用いて性状を確認した後、API20E（シスメックス・ピオメリュー、東京）を用いて、大腸菌を同定した。

薬剤の最少発育阻止濃度（以下 MIC）は、Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) 法に準拠したドライプレート「栄研」（栄研化学、栃木）を用いた微量液体希釈法により決定した。供試薬剤は、アンピシリン (ABPC)、CEZ、セフトキシム (CTX)、メロペネム (MEPM)、ゲンタマイシン (GM)、カナマイシン (KM)、テトラサイクリン (TC)、ナリジクス酸 (NA)、シプロフロキサシン (CPFX)、コリスチン (CL)、クロラムフェニコール (CP)、トリメトプリム・スルファメトキサゾール (ST) の 12 剤を用いた。

CTX 耐性株 (MIC $\geq 2\text{mg/L}$) は、PCase 試験と DDST 法によるスクリーニング後、Dallenne らのマルチプレックス PCR 法により β ラクタマーゼ産生遺伝子型を決定した。

C. 研究結果

大腸菌数は $10^5 \sim 10^8 \text{CFU/g}$ で、採材 2 回目以降には約 10^6CFU/g で推移した。入雛直後 (3~15 日齢) には 4 群全て CEX 添加 DHL 寒天培地上に $10^4 \sim 10^6 \text{CFU/g}$ のコロニーが検出された。その後の発育段階では 4 群中 2 鶏群で CEX 耐性菌は検出されなかったが、無薬飼育と有薬飼育の各 1 鶏群の計 2 鶏群で $10^3 \sim 10^5 \text{CFU/g}$ の CEX 耐性菌が継続的に検出された (図 1)。

4 鶏群中セファレキシン耐性菌のうち、セフォタキシム耐性大腸菌は、CMY-2 型と CTX-M 型であった (表 2)。

CTX 耐性大腸菌 30 株において、TC 耐性 (16 株)、KM 耐性 (11 株)、ST 耐性 (5 株) GM 耐性 (3 株) 及び NA 耐性 (3 株) が認められた (表 3)。農場別では、多剤耐性を示した全ての株は無薬飼育農場由来であった (表 4)。

D. 考察

国内の肉養鶏におけるセファロスポリン耐性大腸菌の分布は、2000 年ごろから認められるようになり、特に肉養鶏においてセファロスポリン耐性大腸菌の増加が顕著になった 2004 年ごろから、鶏肉から分離されるセファロスポリン耐性大腸菌が注目されるようになった。Hiroi ら (2012) は、肉養鶏の腸管内で ESBL 産生大腸菌が出荷まで維持されることを報告した。

業界によるセフトオフルの自主規制後に実施した本研究では、第 1 世代セファロスポリンを用いたが、飼育期間中の肉養鶏におけるセファロスポリン耐性大腸菌の割合は既報に比べて減少し、鶏群によ

って出荷まで継続的に耐性菌を保菌することが明らかとなった。

無薬飼育鶏 3 群中 1 群と有薬飼育鶏 1 群で継続的にセファロスポリン耐性大腸菌が認められた。有薬飼育農場において、6~8 日齢にペニシリン系抗菌薬 (アモキシシリン) が使用されたため、選択圧としてセファロスポリン耐性大腸菌の分布に影響したと考えられた。一方、無薬飼育鶏 3 群は、異なる孵化場から導入したヒナであるため、今後、孵化場の影響も明らかにしていく必要がある。

E. 結論

業界によるセフトオフルの自主規制後のセファロスポリン耐性大腸菌の分布は、鶏群により異なることが示唆された。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

- 1) 浅井鉄夫 野生動物および家畜環境中の耐性菌 第 30 回日本微生物生態学会 (土浦、2015)
- 2) 鈴木香澄、浅井鉄夫 肉養鶏の発育段階における第 3 世代セファロスポリン耐性菌の推移 第 89 回日本細菌学会総会 (大阪、2016) (発表予定)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし