

平成 29 年度厚生労働科学研究費補助金食品安全確保推進研究事業
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

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：

家畜(JVRAN)-人(JANIS)の耐性菌の発生動向を JANIS 解析ソフト上にて一元的に把握できる体制を確立した。ここに食品由来耐性菌のデータを取り込む試みを地方衛生研究所のネットワークを駆使し施行し、実効性が高い結果を得た。我が国の耐性菌の発生動向データを WHO GLASS に報告したが、耐性菌の収集方法上の問題点を指摘されており、JANIS 参加病院における耐性菌検査の精度管理の問題を含め、方法論の改良が必要である。2011 年以降の家畜における抗菌薬使用の抑制を反映して、例えばブロイラーの ESBL 産生大腸菌の分離頻度が激減しているが、一方、人由来 ESBL 大腸菌の分離率は増加傾向にある。この乖離現象を説明できるデータは得られていないが、食鳥処理場における解体時の交差汚染による食肉への耐性菌伝播、人保菌者を介しての一人一人による耐性菌の伝播、人における抗菌薬の過度の使用による耐性菌選択圧の増加などの影響が考えられる。食鳥処理場の交差汚染の程度は、鶏の糞便中の耐性菌率に影響を受けていた。解体時の交差汚染を最小減に抑える方法論、例えば食肉消毒法の改良などとの組み合わせが必要である。ESBL 耐性大腸菌の健康者保菌率は約 5% であり、一人一人伝播への影響評価が今後必要である。食肉検体の汚染率は国産、輸入品とも 50% 近くであり、それらのヒトへの伝播リスクは不明である。耐性菌の発生動向調査だけでは伝播のルート解明には限界があるので、今後は菌体や耐性遺伝子のゲノム情報を含めた総合的解析が必要である。

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
小西典子	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

制の確立や検査法の統一を図ってきている。また、WHO は耐性菌の世界的なコントロールをめざし、Global Action Plan を示し、我が国もそれに基づき、National Action Plan を作成した。それらは、“One Health” の観点から耐性菌のサーベイランスの構築を目指すことを掲げている。本研究においては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菌サーベイランス JANIS のデータを一元的に閲覧し、評価できる手法を開発することと、今まで体系的に集められていない食品由来細菌の耐性データを取り込める体制を構築することを目的とした。食品由来耐性細菌については全国地方衛生研究所協議会に担当してもらい、恒常的にデータの収集をすする仕組みを整える方向性を付けることを目的としている。これらの体制により、国内で分離された臨床、食品および家畜由来耐

A. 研究目的：

耐性菌の問題は健康危機管理としても重要な国際的課題である。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

性菌の動向の把握と、相互の比較解析から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ようになることが期待できる。また、耐性菌分離状況の WHO への報告ができる体制も構築する。

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 や USA 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、小西、倉園、五十君、富田）、人由来株（四宮、小西、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、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 の調査薬剤（LVFX、CTX、MINO、PIPC、AMK、コリスチン）の微量液体希釈法による MIC と、それぞれと同系統の JVARM の調査薬剤（ERFX、CTF、OTC、ABPC、KM、コリスチン）の寒天平板希釈法による MIC を相関係数等によって比較した。
- 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のもも肉に限定した。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。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・スルフアメトキサゾール（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）、スルフイソキサゾール（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。

C. 研究結果:

1) JANISデータの解析:

- (1) WHOのGLASSへの報告: JANISデータベースから2014年、2015年、2016年の血液由来大腸菌、*A. baumannii*、*K. pneumoniae*、黄色ブドウ球菌、肺炎球菌、サルモネラ、ならびに尿由来大腸菌、*K. pneumoniae*のデータを抽出後、GLASS提出用ファイルを作成し、提出した。現在は、各施設から提供されているデータの集計であるが、GLASSは精度管理が行われているデータの提出を求めているので、JANISの体制を国際基準に合わせることに関する議論が今後必要である。
- (2) JANIS データからの食品由来耐性菌の抽出・解析: 血液由来サルモネラについて、JANIS 加盟病院からの報告数は、100 から 300 株程と少ないが、CTX や LVFX に耐性を示したものは数株程度であった（1%未満）。また、JANIS 以外の調査報告から、2015 年では淋菌のセフトリアキソン耐性が 6.2% (38/617)、赤痢菌ではシプロフロキサシン耐性 41.2% (47/114) と比較的高かった。

2) 地方衛生研究所ネットワークを利用した報告:

- (1) サルモネラ: 2017 年、18 剤中の 1 剤以

上に耐性を示した株は、ヒト由来 118/322 株 (36.3%)、食品由来 85/76 株 (89.4%) で、2015~2016 年分離株と同様の傾向であった。6 剤以上に耐性を示す高度耐性株も、ヒト由来株中に 5 株、食品由来株中に 8 株（うち 6 株は外国産鶏肉由来株）に認められた。CTX, CAZ, CFX 耐性は数%あり、一方、アミノグリコシド系薬 GM、AMK、キノロン系薬 CPF、NFLX、ホスホマイシン系薬 FOM、カルバペネム系薬 IPM、MEPM に対する耐性率は低いか、0%であった。

- (2) サルモネラ血清型: 食品由来株において、Infantis, Schwarzengrund, Manhattan が全体の約 8 割を占め、国産鶏肉から検出される主要な血清型と考えられる。特に、Infantis 及び Schwarzengrund ではヒト由来株と食品由来株の耐性傾向に強い類似性が見られ、食品由来耐性菌とヒト由来耐性菌との関連が強く示唆された。
- (3) 大腸菌: 2015~2017 年分離のヒト由来 581 株中の 247 株 (42.5%)、及び食品由来 21 株中の 11 株 (52.4%) が 1 剤以上に耐性を示した。EHEC 以外の下痢原性大腸菌株が EHEC 株よりも耐性率が高く、CTX, CAZ, CFX, キノロン系薬及びカルバペネム系薬 MEPM 等に耐性を示した。外国産食品由来株の耐性率が国産食品由来株よりも高く、国産、外国産間で異なる傾向が見られた。
- (4) コリスチン耐性: コリスチン阻止円径（11 mm 以下、12 mm、13 mm、14 mm 以上に分類）が 11 mm 以下及び 12 mm の 129 株（ヒト由来 98 株、食品由来 31 株）を対象にコリスチン耐性遺伝子の検出を行い、食品由来株 1 株が *mcr-5* 陽性であることを明らかにした。
- (5) ヒト由来カンピロバクターの薬剤耐性菌出現状況（東京都）
2016 年に分離された散発患者由来 *C. jejuni* 113 株のフルオロキノロン耐性率は 52.2% であった。治療の第一選択薬である EM 耐性株は *C. jejuni* で 0.9%、*C. coli* で 14.3% であった。
- (6) 健康者糞便由来大腸菌の薬剤耐性菌出現状況（東京都）: 2017 年に健康者から

分離された大腸菌 521 株の調査；耐性率をみると最も耐性率が高かったのは ABPC で 21.3%，次いで NA 19.5%，TC 14.6%，SM 13.2% の順であった。フルオロキノロン耐性は 8.8%，CTX 耐性は 5.8% であった。CTX 耐性株の 24 株のうち、21 株が ESBL 産生株 (CTX-M-1 group および CTX-M-9 group が各 10 株、TEM 型が 1 株)、3 株が AmpC 産生株であった。

(7) 市販流通する食肉からのコリスチン耐性大腸菌の検出 (東京都)：食肉由来大腸菌 310 株中 *mcr-1* 陽性は、鶏肉由来株では 21 株、豚肉由来株では 2 株であった。国産および輸入別の比較；国産鶏肉は 12.8%，輸入鶏肉は 18.5% が陽性。国産豚肉は 1.8%，輸入豚肉は 1.4% が陽性。

3) 国内食肉衛生検査所・検疫所由来検体調査：2016 年度 (2017 年 2 月～3 月) に収集した国内産鶏肉 110 検体、輸入鶏肉 88 検体の合計 198 検体。

(1) ESBL 産生菌；国内産 78.2%、輸入 15.9%。 (昨年度；国内産 6.7%、輸入 26.3%)。

AmpC 産生菌；国内産 36.4%、輸入食肉 11.4% (昨年と同様)。耐性遺伝子型；国産肉では CTX-M 型 (56.2%)、CTX-M 型+TEM 型 (29.0%)、TEM 型 (15.0%)、輸入肉では CTX-M 型 (73.3%)。CTX-M 型遺伝子として国内産と輸入食肉共に CTX-M2 が優位で、次いで CTX-M1 が分離された。食肉から分離される耐性株の遺伝子型の傾向はこれまでの調査と同じであった。ESBL 産生株、AmpC 産生株 (合計 173 株) の菌種としては *Escherichia coli* が最多であり (155 株 89.6%)、*Salmonella* 属菌が 13 株、*Klebsiella pneumoniae* が 5 株分離された。

(2) コリスチン耐性大腸菌の検出
コリスチン含有培地 (1mg/L) に発育した大腸菌 165 株 (国内産 36 検体 75 株、輸入 54 検体 90 株)；*mcr-1* 陽性株をブラジル産検体から 1 株でた。

(3) VRE の検出
VanA 型 VRE (*E. faecium*) 株がブラジル産鶏肉検体 3 検体から検出された。国内産鶏肉 3 検体から VanN 型 VRE (*E. faecium*) 株が検出された。

4) JVRAM からの報告：

- (1) と畜場及び食鳥処理場由来株の大腸菌、サルモネラについてアンチバイオグラムを作成し動物医薬品検査所 HP (http://www.maff.go.jp/nval/yakuzai/yakuzai_p3-1.html) に掲載した。
- (2) と畜場及び食鳥処理場由来大腸菌におけるプラスミド性コリスチン耐性遺伝子の保有状況について；*mcr-1* は牛由来株からは検出されなかったが、豚由来株では平成 24 年 2 株 (1.0%：割合は、各年の各動物種由来株全株に対するもの)、平成 25 年 1 株 (0.8%)、平成 26 年 1 株 (1.1%)、平成 27 年 0 株 (0%) 分離され、鶏由来株からは、平成 24 年 0 株 (0%)、平成 25 年 4 株 (2.4%)、平成 26 年 2 株 (1.2%)、平成 27 年 9 株 (4.9%) 検出された。また、*mcr-5* 遺伝子は牛由来株は平成 27 年のみ 1 株 (0.4%)、豚由来株では平成 24 年のみ 1 株 (0.5%) 分離され、鶏由来株からは、平成 24 年 3 株 (2.3%)、平成 25 年 3 株 (1.8%) 平成 26 年 1 株 (0.6%) 検出された。*mcr-2*、*mcr-4* 及び *mcr-3* 遺伝子についていずれの菌株からも分離されなかった。

5) 農場、食鳥処理場等での汚染の検討

- (1) 家畜を飼育する農場における薬剤耐性菌の汚染様式の検討：昨年度の調査で、導入ヒナの敷紙から CTX-M-25 産生 *E. cloacae* 及び CTX-M-25 産生 *K. pneumoniae* が分離された。2016 年 12 月～2017 年 8 月に分離されたサルモネラ 784 株でセファロスポリン耐性は認められなかった。一方、遡り調査の結果、導入ヒナと飼料が Schwarzengrund で汚染していたが、導入ヒナが農場内でサルモネラが定着する要因と考えられた。サルモネラを含む薬剤耐性菌の侵入防止は、ヒナの衛生管理が重要と考えられた。
- (2) 食鳥処理工程での薬剤耐性菌対策の検討：部位別 (モモ、ムネ、ササミ、手羽先、手羽元、レバー、砂肝) に汚染状況を調べたところ、レバーの汚染が高いことを明らかにした。また、セファロスポリン耐性大腸菌の汚染状況 (赤色コロニー細菌中の約 30 分の 1) は部位により異なり、水洗回数が多い部位で低度であ

った。

- (3) 食鳥処理場（盲腸内物及び鶏肉）及び採卵鶏農場（糞便）における ESBL 産生大腸菌汚染について；鶏肉における ESBL 分離率は 1 検体（3%；すべて CTX-M-2）と低かったが、その原因は、その由来となった鶏群の感染率が 13%（4/32）と低かったためであると考えられた。一方、採卵鶏農場における ESBL 産生大腸菌分離率は 30%（9/30）であり、関東周辺よりも九州周辺の農場の方が、分離率が高い傾向であった。耐性遺伝子は CTX-M-1 が最もよく分離され、7 農場（23%）から分離された。若齢鶏群から分離されることが多く、廃用に近い鶏群からの分離率は低かった。

D. 考察

- 1) **統合的耐性菌サーベイランスの確立と問題点**；JANIS, JVARM が施行している薬剤耐性測定法（使用薬剤、耐性値等）の調整を行い、各々のデータを同一フォーマット上で比較解析できるようにした。この中に、食品から分離される耐性菌のデータを入れ込み、家畜—食品—一人から分離される耐性菌の動向を一元的にみられるようにすることが次の課題である。そのために、食品由来の耐性菌の動向調査を継続的に行う組織が必要である。現在のところ、食中毒等の調査及びそれに関連する食品由来菌の収集解析を行っている地方衛生研究所が担当することが適していると思われる。各都道府県に少なくとも一つは存在する地方衛生研究所ならば、全国的な食品由来細菌の耐性菌のデータを得ることができるし、継続的な対応が可能であろう。しばらくは、研究費活動において動向調査の礎を築くことになるが、将来的には JANIS や JVARM のように責任部署の対応による事業として対応することが望ましい。そのために解決しなければならない点はどこにあるのかの検討が必要であろう。
- 2) **ESBL 大腸菌の人および家畜からの分離率の乖離**：研究班の成果として、特に大腸菌の ABPC、CEZ、CTX、キノロン

について人および家畜からの分離菌耐性率の年次推移の比較を容易にできるようになった。人からの分離菌では CEZ、CTX、LVFX の耐性率は年々増加が続いているが、家畜では耐性率は低く、特に肉用鶏では 2011 年以降、CEZ、CTX の耐性率が急減している。これは畜産分野での抗菌薬の使用状況を反映しているものと考えられる（特にブロイラーへのセフトイオールの投与の中止）。一般的には、ヒトから分離される ESBL 産生大腸菌の多くは、鶏の ESBL 産生大腸菌又は ESBL 産生遺伝子が、鶏肉を通じ、ヒトに伝播したものと考えられている。耐性菌あるいは耐性遺伝子が最初に人に入り込んだのは、人以外のところ（おそらく食品等を通して）から入り込んだのであろうが、その後の拡散、拡大はそれだけでは説明できないということであろう。いくつかの可能性を想定する必要がある。

(1) 食鳥処理場等における交差汚染による耐性菌の拡散、(2) 小売店、家庭等における交差汚染による食肉への耐性菌拡散、(3) ヒトへの抗菌薬の投与による耐性菌の選択、拡散、(4) 耐性菌保菌者を介しての人—人伝播による拡散、などを考える必要がある。

- 3) **食鳥処理場等における交差汚染による耐性菌の拡散**；今回の調査では食鳥処理場で処理される鶏の糞便中の汚染率の高低により、食肉の汚染率が影響される傾向にある。解体時の直腸結紮などの処理工程における糞便の汚染をどれだけ最小にとどめられるか。交差汚染を完全に防ぐことが困難な鶏製品においては、即効的で安全な消毒方法の開発などが必要であろう。

- 4) **家畜—食品—一人由来菌の耐性菌測定上のバイアスおよび問題点**；食品においては、一定量の食品含有培養液を抗菌薬含有選択培地に直接塗布することにより耐性菌を分離し、全検体中の耐性陽性検体数として耐性率を計算している。定性的測定となっている。また、食品から特定の菌種株を分離後、その菌株について耐性率を調べる場合もあるが、1 食品検体当たりの調査株数が一定してい

ない傾向にある。一方、家畜の場合（JVARM）には、各家畜糞便から対象菌2菌株を分離し、その菌の薬剤耐性を調査し、総調査細菌数の内の耐性菌率を求めている。調査が2菌株なので、1家畜の糞便中の耐性菌数が少ない場合には見逃している可能性がある。人から（JANIS）は、患者検体から分離された各対象菌種総株数のうちの耐性菌率を表している。参加病院が任意であるので耐性菌測定のパフォーマンス管理が一元化されていないこと、および患者検体から病因菌といて疑われる菌種が調査される傾向にあるので、抗菌薬の投与歴による選択圧などのバイアスがかかっている可能性もある。それぞれの耐性率の表現手法が異なるので、一概にお互いのデータを比較することには問題があるかもしれない。耐性率の比較からの伝播経路の推定には限界がある。今後は、菌体自体、耐性遺伝子、プラスミドの遺伝子配列によるゲノム解析の結果も考慮しての評価が必要であろう。

- 5) **耐性菌保菌者を介しての人一人伝播による拡散**：今回の調査では、健康人の糞便（飲食店従事者521人から分離された521株の大腸菌中）からESBL大腸菌が約5%分離されている。健康保菌者が人一人伝播にどれぐらい関与してい

るかの正確なデータは我が国においては把握されていない。耐性菌の母親から乳児への伝播、耐性菌の健康保菌者の家族内伝播の重要性は文献的には指摘されてきたところである。今後、健康保菌者の耐性菌伝播に果たすリスク解析を菌株のゲノムレベルで行う必要がある。リスクの程度が判明すれば、人一人伝播を防止する介入手法の検討に結びつけられるであろう。

- 6) **コロスチン耐性株の伝播**：コロスチン耐性株は最近報告され、世界的に注目されている。今回の調査において、我が国においても家畜、食品等から分離されることが明らかになった。コロスチンは長らく家畜等に感染予防的に使用されてきているが、人にはその毒性のため使用されてきていなかった。耐性が家畜の環境内で選択され、それが食肉に拡散していることは明らかであろう。健康人の腸内細菌叢の中に耐性遺伝子が既に入り込んでいることが報告されているので、食肉等を介しての遺伝子の伝播が起こっていると想定される。CREの治療にコロスチンの使用が認められるような状況において、コロスチン耐性菌の拡散が危惧されている。発生動向の継続とヒトへの拡散ルートの解析が重要である。

E. 結論

家畜（JVARM）-食品一人（JANIS）の耐性菌の発生動向を一元的に把握する体制の構築に向けて進んできている。食品由来耐性菌の動向把握を継続的に進めるためには地方衛生研究所の役割りが大きなウエイトを占める。今後に向けての具体的検討が必要である。家畜由来の耐性菌が食品を介して人に入っていることは確かなことであろうが、ESBL大腸菌の例を取れば、人由来株のESBL大腸菌の耐性率は、家畜由来ESBL大腸菌の耐性率の低下とは逆に、増加傾向にある。この乖離現象を十分に説明できるデータは得られていないが、食品以外の影響、例えば人一人伝播のリスクを考慮する必要がある。今後は動向調査以外に菌体、耐性遺伝子のゲノムデータを考慮に入れた解析が必要である。

F. 知的財産権の出願・登録状況

なし

G. 健康危険情報

肉用鶏の生産から食鳥処理の過程で、薬剤耐性菌による最終製品の汚染を制御するため、生産段階では、サルモネラを含む薬剤耐性菌の侵入経路と消毒効果に関する監視は極め

て重要である。また、食鳥処理段階では、汚染リスクの高い部位における効果的な消毒薬の開発や消毒方法の改良が重要である。

H. 研究発表 別紙に記載。