

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 29 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 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	小西 典子	(東京都健康安全研究センター微生物部)
研究協力者	尾畑 浩魅	(東京都健康安全研究センター微生物部)
	赤瀬 悟	(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)
	小野明日香	(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)
	平井 昭彦	(東京都健康安全研究センター微生物部)
	甲斐 明美	(国立感染症研究所 細菌第一部)

研究要旨

2017 年にヒトから分離されたサルモネラは 120 株のうち 1 薬剤以上に耐性を示した株は 49.2% で、食品由来株の 89.8% と比較して耐性率は低かった。

フルオロキノロン系薬剤である CPFX および NFLX に耐性を示す株はヒト由来株で 2 株 (1.7%)、食品由来株では認められなかった。フルオロキノロン耐性株 2 株中 1 株は、9 薬剤に耐性を示す多剤耐性菌であった。この様な多剤耐性株が拡大すれば、ヒトの治療に大きな影響があるものと示唆されたが、現時点ではサルモネラのフルオロキノロン耐性率はそれほど高くなく、また増加傾向も認められていないため拡大は限定的なものと考えられた。第 3 世代セファロスポリン系薬剤である CTX 耐性株はヒト由来株で 3 株 (2.5%)、食品由来株で 9 株 (7.0%) であり、2016 年分離株 (ヒト由来株 4 株、食品由来株 6 株) より増加していた。

2016 年に散発下痢症患者から分離した *C. jejuni* および *C. coli* のフルオロキノロン耐性率はそれぞれ 52.2% および 35.7% であった。*C. jejuni* は例年とほぼ同様の耐性率であったが、*C. coli* は 2011 年の 87.5% と比較して年々減少傾向であった。また治療の第一選択薬である EM に対しては、いずれの菌種とも耐性率は低く EM 耐性菌の増加は認められなかった。

市販の食肉から分離された大腸菌を対象にプラスミド性コリスチン耐性遺伝子 (*mcr-1*) 保有状況を調べた結果、鶏肉由来株では 21 株、豚肉由来株では 2 株が陽性となった。

国産鶏肉は 86 検体中 11 検体 (12.8%)、輸入鶏肉は 27 検体中 5 検体 (18.5%)、国産豚肉は 55 検体中 1 検体 (1.8%)、輸入豚肉は 71 検体中 1 検体 (1.4%) から *mcr-1* 保有大腸菌が検出されたことから、食肉には広く *mcr-1* 保有大腸菌が存在することが明らかとなった。耐性菌で汚染された食肉を介して耐性菌が拡大していく可能性も考えられるため、今後もヒトからの検出状況等監視していく必要がある。

A. 研究目的

ヒトの治療に影響を与える薬剤耐性菌の出現が依然として増加しており、世界的な問題となっている。このような状況下、2011 年 WHO は薬剤耐性菌に対し、ヒト、動物、環境といった垣根を越えた「One health」としての世界規模の取り組みの必要性を示した。薬剤耐性菌は医療現場のみならず、動物、家畜、水産および環境に至るすべての生態系で発生し拡散していくという考え方である。これらの考えを受け、

わが国でも耐性菌をコントロールするための「薬剤耐性 (AMR) 対策アクションプラン」が 2016 年 4 月に示され、抗菌薬の適正な使用と薬剤耐性菌の動向調査・監視の強化等を行うことになった。

耐性菌の蔓延を防止するためには、その基礎資料となる薬剤耐性菌の変化や拡大を継続的に監視していくことが重要である。

そこで今回、人および食品から分離されるサルモネラ、カンピロバクターおよび大腸菌につ

いて薬剤耐性菌出現状況を調べた。

B. 研究方法

1. ヒトおよび食品から分離されたサルモネラの薬剤耐性菌出現状況

1) 供試菌株

2017年にヒト（下痢症患者および無症状病原体保有者）から分離された120株および食品から分離された128株を供試した。集団事例由来株は代表株1株を計上した。

2) 薬剤感受性試験

薬剤感受性試験に用いる薬剤は、同じく研究分担者である埼玉県衛生研究所と共通の薬剤を用いた。すなわちABPC, GM, KM, SM, TC, SXT, CP, CTX, Su, FOM, NA, CPF, NFLX, AMK, IPM, MEPMの16薬剤である。更に一部の株については、セフトジジム(CAZ), セフォキシチン(CFX), コリスチン(CL)を追加した。これらの薬剤についてセンシディスク(BD)を用いたKBディスク法で調べた。

2. ヒト由来カンピロバクターの耐性菌出現状況

2016年に都内病院で分離された*C. jejuni* 113株および*C. coli* 14株を対象に薬剤感受性試験を行った。供試薬剤はABPC, TC, NA, CPF, NFLX, OFLX, EMの7薬剤である。

3. 健康者糞便由来大腸菌の薬剤耐性菌出現状況

2017年に搬入された飲食店従事者（下痢等の症状が無い者）の糞便521人から分離された大腸菌521株を供試した。これらの菌株を対象にサルモネラと同様の16薬剤にOFLXを加えた17薬剤を用いた薬剤感受性試験を行った。CTX耐性株についてはAmpC/ESBL鑑別ディスク（関東化学）を用いてAmpCまたはESBL産生菌の鑑別を行った。さらにESBL産生菌を疑う株についてはShibataらのプライマーおよび市販のプライマー（ESBL遺伝子型別キット、関東化学）を用いて型別試験を実施した。

4. 市販流通する食肉からのコリスチン耐性大腸菌の検出

1) 供試検体

2015年から2016年に都内で流通した鶏肉113検体（国産86検体、輸入27検体）、豚肉126検体（国産55検体、輸入71検体）を用いた。

2) 大腸菌分離方法

食肉25gに普通ブイヨン30mlを加えストマッキング後、乳剤をXM-G寒天培地（日水製薬）に滴下し、分離培養を行う方法と、食肉25gに緩衝ペプトン水（BPW）225mlを加え35℃で18時間培養後、XM-G寒天培地に分離培養する方法で行った。塗抹したXM-G寒天培地は、35℃、18～24時間培養し、出現した大腸菌定型集落を薬剤感受性試験に供試した。

3) 供試菌株

鶏肉由来310株（国産240株、輸入70株）、豚肉由来117株（国産54株、輸入63株）の大腸菌を供試した。

4) 薬剤感受性試験

コリスチンに対するMICを寒天平板希釈法（0.25μg/mL～16μg/mL）で測定した。MICが4μg/mL以上の株についてプラスミド性コリスチン耐性遺伝子（*mcr-1*）の保有をPCR法で確認した（Liu YY, *et al.* Lancet. Infect. Dis, 2016）。

4. 倫理面への配慮

全てのヒト由来株および調査情報は、個人を特定できる情報を含まない状況で収集し、本研究に用いた。なお、本研究は東京都健康安全研究センター倫理審査委員会の承認を受けている。

C. 研究結果

1. ヒトおよび食品から分離されたサルモネラの薬剤耐性菌出現状況

2017年にヒトから分離されたサルモネラは120株で34血清型に、食品由来株は128株で12血清型に分類された（表1）。分離された血清型を比較すると04群Schwarzengrund, 04群Agona, 07群Infantisはヒトおよび食品由来共に多く分離されていた。

ヒト由来株120株のうち1薬剤以上に耐性を示した株は49.2%で、食品由来株の89.8%と比較して耐性率は低かった。血清群別では04群56株中37株（66.1%）、07群26株中10株（38.5%）、08群15株中5株（33.3%）、09群14株中5株（35.7%）、03,10群5株中2株（40.0%）であった。013, 016および018群に耐性菌は認められなかった（表2）。

一方、食品由来128株のほぼ全ての株は鶏肉および鶏肉内臓肉由来であった。供試した薬剤16薬剤中1薬剤以上に耐性を示した株は128株中115株（89.8%）で耐性率は非常に高かった。血清群ごとに分離菌株数と耐性率をみると04群は64株中62株（96.9%）、07群は40株中

33株 (82.5%), 08群は9株中9株 (100.0%) であった (表2)。

フルオロキノロン系薬剤である CPFX および NFLX に耐性を示す株はヒト由来株で2株 (1.7%), 食品由来株では認められなかった。ヒト由来フルオロキノロン系薬剤耐性株の血清型はそれぞれ 04群 Saintpaul および 08群 Colvallis であった。

第3世代セファロスポリン系薬剤である CTX 耐性株はヒト由来株で3株 (2.5%), 食品由来株で9株 (7.0%) であり, 2016年分離株 (ヒト由来株4株, 食品由来株6株) より増加していた (図1)。CTX耐性株の血清型はヒト由来株では04群 Saintpaul, 08群 Blockley, 03, 10群 Anatum (各1株), 食品由来株は08群 Blockley (3株), 04群 Schwarzengrund および 07群 Infantis (各2株), 04群 Agona および 08群 Manhattan (各1株) であり, ヒト由来株と食品由来株に共通に検出された血清型は08群 Blockley であった (表3)。

2. ヒト由来カンピロバクターの薬剤耐性菌出現状況

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。2015年分離株と比較すると増加していたが, 過去6年間の耐性率を比較すると, ほぼ横ばいであった (図2)。一方, *C. coli* 14株の耐性率は35.7%で, *C. jejuni* より耐性率は低かった (図3)。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 (図2, 図3)。

3. 健康者糞便由来大腸菌の薬剤耐性菌出現状況

2017年に健康者から分離された大腸菌521株を対象に17薬剤を用いた薬剤感受性試験を行ったところ, いずれか1薬剤以上に耐性を示した株は190株 (36.5%) であった。薬剤別に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 (図4)。CTX耐性株のうち24株についてESBLあるいはAmpC産生の確認を行った結果, 21株がESBL産生株, 3株がAmpC産生株であった。ESBL産生株の遺伝子型を調べた結果, CTX-M-1 group および CTX-M-9 group が各10株, TEM型が1株であった。

プラスミド性コリスチン耐性遺伝子は2株で

陽性となった。これらは1月および3月に分離された株で, コリスチンに対するMIC値(Etest)は2および4 $\mu\text{g/ml}$ であった。

4. 市販流通する食肉からのコリスチン耐性大腸菌の検出

市販の食肉 (鶏肉, 豚肉) から分離された大腸菌を対象にコリスチンに対するMICを寒天平板希釈法で測定した。4 $\mu\text{g/ml}$ 以上に耐性を示した株は, 鶏肉由来では310株中22株 (7.1%), 豚肉由来117株中2株 (1.7%) であった。これらの株を対象に *mcr-1* の保有をPCR法で調べた結果, 鶏肉由来株では21株, 豚肉由来株では2株が陽性となった (表4)。

mcr-1 保有大腸菌の検出状況を国産および輸入別に比較した。国産鶏肉は86検体中11検体 (12.8%), 輸入鶏肉は27検体中5検体 (18.5%), 国産豚肉は55検体中1検体 (1.8%), 輸入豚肉は71検体中1検体 (1.4%) から *mcr-1* 保有大腸菌が検出された。

D. 考察

ヒトおよび食品から分離されたサルモネラの血清型を比較すると, 04群 Schwarzengrund, 07群 Infantis, 04群 Agona が共通して高率に検出されていることから, 食品 (鶏肉および鶏肉内臓肉) がヒトのサルモネラ症に影響を与えていることが示唆された。近年はヒトから分離される血清型に変化が認められており, これまでヒトから最も多く分離されていた血清型 Enteritidis が減少し, 04群 Schwarzengrund や 07群 Infantis が多く分離されてきている。またこれまで鶏肉からの分離では 07群 Infantis が最も多かったが, 2016年度から 04群 Schwarzengrund が多く検出されるようになってきている。この様にサルモネラの検出状況を長期的にみていくと, ヒト由来および食品由来株共に, 年代によって流行する血清型に変化が認められることが明らかとなった。

分離された株の薬剤耐性率を比較すると, 耐性率はヒト由来株で49.2%, 食品由来株では89.8%と, 食品由来株の方が耐性率は高かった。この傾向は例年と同様である。

ヒト下痢症の治療薬として主に用いられているフルオロキノロンに対する耐性株は, ヒト由来株2株のみであり, 耐性率は低かった。しかし, このうち1株は ABPC, CTX, SM, TC, CPFX, NA, ST 合剤, CP, Su の9薬剤に対する多剤耐性菌であった。この患者は散発患者であるが, 感染源等は不明であった。このようなフルオロ

キノロンおよび第3世代セファロスポリン系薬剤に耐性を示す株が蔓延すれば、治療に少なからず影響がでるものと考えられた。現時点ではサルモネラのフルオロキノロン耐性率はそれほど高くなく、また増加傾向も認められていないため拡大は限定的なものと考えられた。

CTX 耐性株の分離状況をみると、2015 年以降急激に増加している。特に食品由来株が多いが、今後ヒトからの分離状況も注意していく必要がある。

カンピロバクター食中毒は依然として多く発生しており、東京都では 2017 年に発生した食中毒 126 事例中 44 事例 (34.9%) がカンピロバクターによるものである。2016 年に分離された散発患者由来 *C. jejuni* のフルオロキノロン耐性率は 52.2%、*C. coli* では 35.7%であった。2011 年～2016 年に分離した株についてフルオロキノロン耐性率を比較すると、*C. coli* ではやや減少傾向であった。*C. coli* の分離数は少ないことから単純な比較は難しいと考えられるが、今後の動向を注意深く見る必要があると考えられた。一方、治療の第一選択薬である EM の耐性率は、*C. jejuni* 0.9%、*C. coli* 14.3%であった。いずれの菌種とも耐性率は低く EM 耐性菌の増加は認められていない。

健康者由来大腸菌の薬剤耐性菌出現状況を調査した結果、いずれか 1 薬剤以上に耐性を示す株は 36.5%で、2015 年 (46.1%)、2016 年 (37.6%) と比較して減少していた。キノロン系薬剤である NA の耐性率は 19.5%であったが、フルオロキノロン系薬剤である CPFX、NFLX、OFLX の耐性率は 8.8%であった。CTX 耐性株は 30 株 (5.8%) であった。このうち 24 株について調べた結果、ESBL 産生株が 21 株、AmpC 産生株は 3 株であった。ESBL 産生株の遺伝子型をみると、CTX-M-1 group および CTX-M-9 group が各 10 株であった。CTX-M-1 group の中には世界的な流行株である CTX-M-15 が含まれていることから、今回分離された株もこれらが含まれている可能性があると考えられる。また、*mcr-1* 保有株が 2 株認められた。このことから健康者由来株の中にもプラスミド性コリスチン耐性株が広がっていることが明らかとなった。

市販食肉を対象として、プラスミド性コリスチン耐性遺伝子保有大腸菌の分離を試みた結果、国産鶏肉の 12.8%、輸入鶏肉では 18.5% から検出された。産地はいずれもブラジル産であった。豚肉では国産の 1.8%、輸入の 1.4% から検出された。輸入豚肉の産地はスペインであった。コリスチンに対する MIC は、いずれも

8 μ g/ml 以上であった。家庭では鶏肉や豚肉は、いずれも加熱調理して喫食する食材であることから、直接コリスチン耐性菌を摂取する機会は少ないと考えられる。しかし、生の鶏肉および鶏内臓肉を提供する飲食店があることや、生肉を取り扱った調理器具や調理従事者の手指からの二次汚染した食品を介してヒトが摂取する可能性もある。今後も耐性菌検出状況についてモニタリングをすると同時に、ヒトへの感染状況についても監視していく必要がある。

E. 結論

2017 年にヒトから分離されたサルモネラは 120 株で 34 血清型に、食品由来株は 128 株で 12 血清型に分類された。分離された血清型を比較すると 04 群 Schwarzengrund, 04 群 Agona, 07 群 Infantis はヒトおよび食品由来共に多く分離されていた。

ヒト由来株 120 株のうち 1 薬剤以上に耐性を示した株は 49.2%で、食品由来株の 89.8%と比較して耐性率は低かった。

フルオロキノロン系薬剤である CPFX および NFLX に耐性を示す株はヒト由来株で 2 株 (1.7%)、食品由来株では認められなかった。フルオロキノロン耐性株 2 株中 1 株は、9 薬剤に耐性を示す多剤耐性菌であった。第3世代セファロスポリン系薬剤である CTX 耐性株はヒト由来株で 3 株 (2.5%)、食品由来株で 9 株 (7.0%) であり、2016 年分離株 (ヒト由来株 4 株、食品由来株 6 株) より増加していた。

2016 年に散発下痢症患者から分離した *C. jejuni* および *C. coli* のフルオロキノロン耐性率はそれぞれ 52.2%および 35.7%であった。*C. jejuni* は例年とほぼ同様の耐性率であったが、*C. coli* は 2011 年の 87.5%と比較して年々減少傾向であった。また治療の第一選択薬である EM に対しては、いずれの菌種とも耐性率は低く EM 耐性菌の増加は認められなかった。

市販の食肉 (鶏肉、豚肉) から分離された大腸菌のうちコリスチンに対する MIC 4 μ g/ml 以上に耐性を示した株は、鶏肉由来では 310 株中 22 株 (7.1%)、豚肉由来 117 株中 2 株 (1.7%) であった。*mcr-1* の保有株は、鶏肉由来株では 21 株、豚肉由来株では 2 株であった。

mcr-1 保有大腸菌が国産鶏肉 86 検体中 11 検体 (12.8%)、輸入鶏肉 27 検体中 5 検体 (18.5%)、国産豚肉 55 検体中 1 検体 (1.8%)、輸入豚肉 71 検体中 1 検体 (1.4%) から検出されたことから、食肉には広く *mcr-1* 保有大腸菌が存在することが明らかとなった。耐性菌で汚染された食

肉を介して耐性菌が拡大していく可能性も考えられるため、今後もヒトからの検出状況等監視していく必要がある。

F. 研究発表

1. 学会発表

1) 下島優香子, 西野由香里, 井田美樹, 福井理恵, 森田加奈, 黒田寿美代, 平井昭彦, 貞升健志: 東京都内に流通する食肉からの *mcr-1* 保有コリスチン耐性大腸菌検出状況, 第 160 回日本獣医学会, 2017 年 9 月, 鹿児島県.

2) 佐藤友美, 臼井優, 小西典子, 甲斐明美, 松井秀仁, 花木秀明, 田村 豊: 牛及び市販食肉由来メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) の特徴とヒトへの影響, 第 91 回日本感染症学会, 2017 年 4 月, 東京.

3) 小西典子, 平井昭彦, 甲斐明美, 貞升健志: 健康者の糞便から分離された大腸菌の薬剤耐性菌検出状況, 第29回日本臨床微生物学会総会・学術総会, 2018年2月, 岐阜県.

2. 論文発表

1) Sato T, Usui M, Konishi N, Kai A, Matsui H, Hanaki H, Tamura Y.: Closely related methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from retail meat, cows with mastitis, and humans in Japan. : PLoS One. 2017 Oct 30;12(10):e0187319.doi:10.1371/journal.pone.0187319. eCollection 2017.

G. 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

表1. ヒトおよび食品由来サルモネラの上位血清型(2017年, 東京都)

ヒト由来株			食品由来株		
O群	血清型	分離数 (%)	O群	血清型	分離数 (%)
O4	Schwarzengrund	14 (11.7)	O4	Schwarzengrund	48 (37.5)
O7	Infantis	12 (10.0)	O7	Infantis	37 (28.9)
O4	Saintpaul	12 (10.0)	O4	Agona	14 (10.9)
O9	Enteritidis	12 (10.0)	OUT	r:1,5	8 (6.3)
O4	Typhimurium	7 (5.8)	O8	Blockley	5 (3.9)
O4	i:-	7 (5.8)	O8	Manhattan	4 (3.1)
O4	Agona	5 (4.2)	O7	Colindale	3 (2.3)
O7	Thompson	5 (4.2)	O9	Enteritidis	3 (2.3)
O4	Stanley	4 (3.3)	O3,10	Anatum	2 (1.6)
O8	Newport	4 (3.3)	OUT	d:1,7	2 (1.6)
O4	Reading	3 (2.5)	O4	Typhimurium	1 (0.8)
O7	Virchow	3 (2.5)	O4	Heidelberg	1 (0.8)
O8	Manhattan	3 (2.5)			
O3,10	Anatum	3 (2.5)			
O7	Rissen	2 (1.7)			
O8	Blockley	2 (1.7)			
O8	Litchfield	2 (1.7)			

集団事例は1株を計上

ヒト由来株:120株, 34血清型, 型別不能:4株, 食品由来株:128株, 12血清型

表2. 東京都で分離されたサルモネラの薬剤耐性率(2017年)

O群	ヒト由来株			食品由来株		
	供試数	耐性数	(%)	供試数	耐性数	(%)
O4	56	37	(66.1)	64	62	(96.9)
O7	26	10	(38.5)	40	33	(82.5)
O8	15	5	(33.3)	9	9	(100)
O9	14	5	(35.7)	3	1	(33.3)
O3,10	5	2	(40.0)	2	0	
O13	1	0				
O16	2	0				
O18	1	0				
OUT				10	10	(100)
合計	120	59	(49.2)	128	115	(89.8)

表3. 2017年に分離されたCTX耐性サルモネラの血清型(東京都)

O群	血清型	ヒト由来	食品由来	由来
O4	Schwarzengrund		2	胸肉, 鶏皮
O4	Agona		1	豚ハラミ
O4	Saintpaul	1		
O7	Infantis		2	鶏肉, 白レバー
O8	Manhattan		1	ささみ
O8	Blockley	1	3	胸肉, 鶏もも, ハツ・レバー
O3,10	Anatum	1		
	合計	3	9	

表4. 食肉由来大腸菌の*mcr-1*保有状況

検出状況											
検体	期間	原産	供試 検体数	<i>mcr-1</i> 陽性検体数 (%)	供試 菌株数	菌株数					
						CL MIC(μ g/ml)				<i>mcr-1</i>	
						≤ 2	4	8	16	(+)	(-)
鶏肉	2011-12	国産	69	1(1.4)	163	159	2	2		1	3
		輸入	100		190	188	2			0	2
	2015-16	国産	86	11(12.8)	240	228		10	2	11	1
		輸入	27	5(18.5)	70	60		10		10	0
豚肉	2015-16	国産	55	1(1.8)	54	53		1		1	0
		輸入	71	1(1.4)	63	62		1		1	0
プラスミド											
検体	原産国	株数	<i>mcr-1</i> 保有プラスミド								
			サイズ (kb)	レプリコン型							
鶏肉	国産	12	60	Incl2							
	ブラジル産	10	30	IncX4							
豚肉	国産	1	250	IncH11							
	スペイン産	1	30	IncX4							

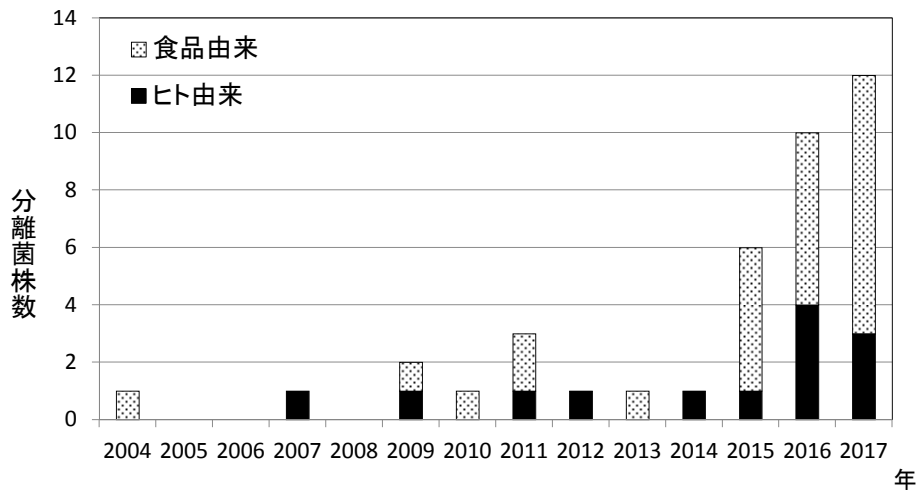


図1. CTX耐性サルモネラの分離状況(東京都)

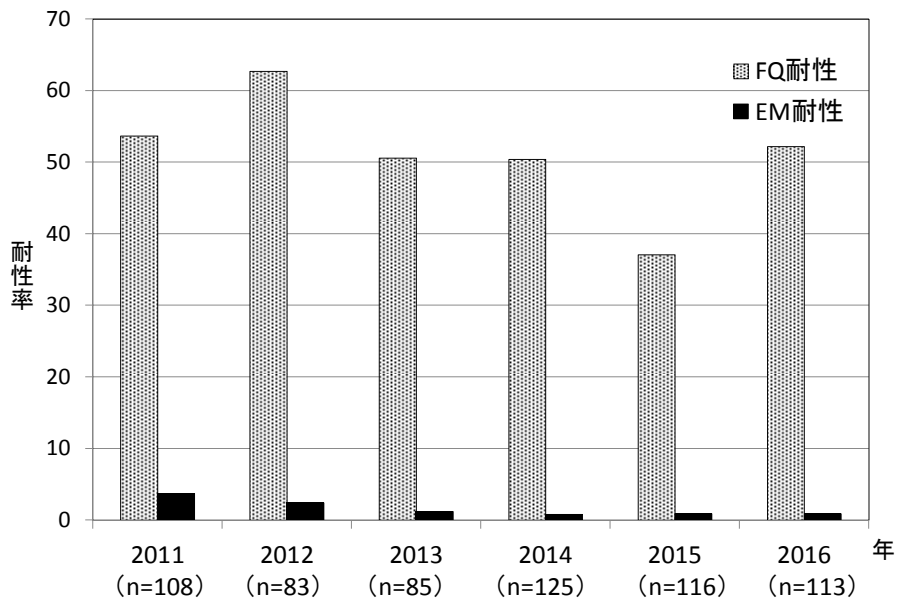


図2. 散発下痢症由来株*C. jejuni*の薬剤感受性試験成績

供試薬剤: ABPC, TC, EM, NA, CFX, NFLX, OFLX

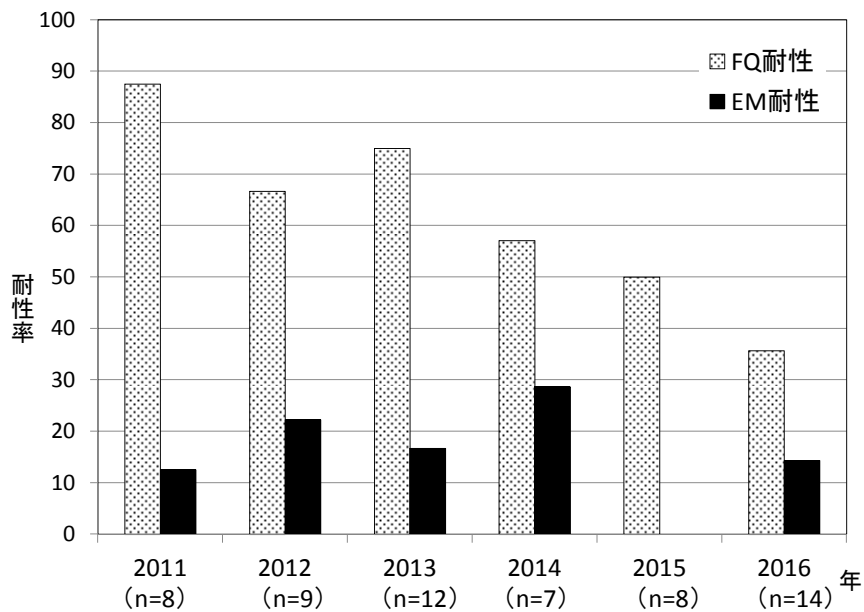


図3. 散発下痢症由来株 *C. coli* の薬剤感受性試験成績

供試薬剤: ABPC, TC, EM, NA, CPF, NFLX, OFLX

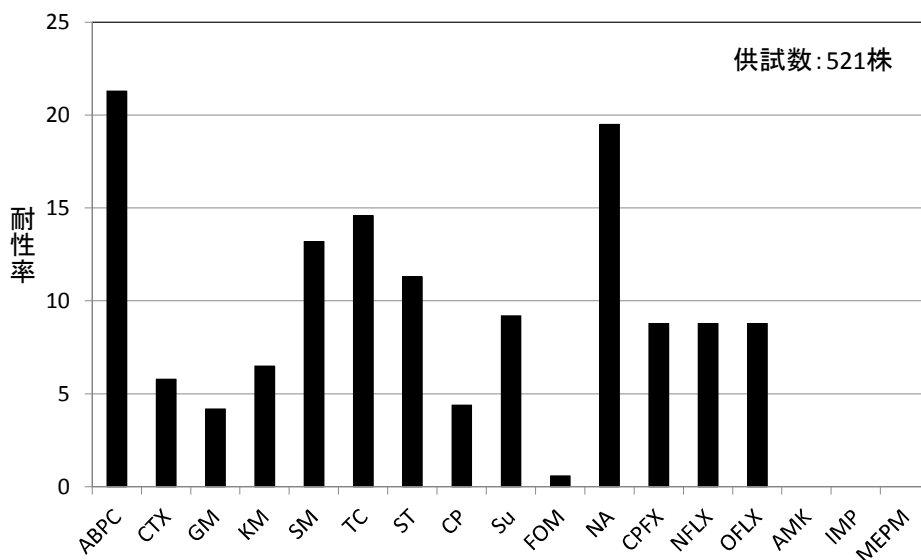


図4. 健康者糞便由来大腸菌の薬剤別耐性率(2017年, 東京都)