

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 27～29 年度 分担（総合）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 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	（東京農業大学応用生物化学科・微生物学・教授）
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・教授）
	朝倉 宏	（国立医薬品食品衛生研究所 食品衛生管理部・部長）
	佐々木 貴正	（国立医薬品食品衛生研究所 食品衛生管理部・第一室長）
	山本 詩織	（国立医薬品食品衛生研究所 食品衛生管理部・研究員）
	中山 達也	（国立医薬品食品衛生研究所 食品衛生管理部・研究員）
	百瀬 愛佳	（国立医薬品食品衛生研究所 食品衛生管理部・研究員）

研究要旨

基質特異性拡張型 β ラクターマーゼ (ESBL) 産生大腸菌は鶏肉からの分離が高いことが報告されており、鶏肉由来 ESBL 産生大腸菌が有するプラスミドがヒト腸管内に元來定着している大腸菌に伝播することで ESBL 産生菌の拡散に寄与している可能性が示唆されている。さらに、鶏肉からのバンコマイシン耐性腸球菌 (VRE) の検出事例もあり、鶏肉が ESBL 産生菌並びに VRE のヒトへの伝播に最も重要な食品であるとされている。本研究では、ESBL 産生大腸菌については、国産・輸入市販鶏肉、食鳥処理場、採卵鶏農場を対象としての汚染実態を調査すると共に、東邦大学医学部の協力によりヒトからの分離菌株との比較を行い、国内の鶏肉生産環境における ESBL 産生大腸菌の分布状況とその諸性状に関する検討を行った。また、バンコマイシン耐性腸球菌 VRE については、国産・輸入市販鶏肉の汚染実態調査を行い考察した。

平成 27 年度の研究では、国内の市販鶏肉が ESBL 産生大腸菌および VRE のいずれにも汚染されている実態を明らかにし、ESBL 産生大腸菌はヒトへの当該菌の伝播には鶏肉が最も重要である可能性が示唆された。一方、VRE は鶏肉から高頻度で検出されたものの、臨床上で重要視される VRE による汚染は少ないと考えられた。

平成 28 年度には、ESBL 産生大腸菌株が保有する IncI1 プラスミドの分子疫学的傾向について検討を行った。その結果、鶏肉由来 ESBL 産生大腸菌の多くがヒト由来 ESBL 産生大腸菌で多く認められる遺伝子を保有していた。また、IncI1 プラスミドの多くが CC-3 に分類され、これらが接合伝達性を示したことから、ヒトへの伝播に CC-3 型 IncI1 が関与している可能性が示唆された。一方、VRE では、分離株のほとんどがヒト臨床分離株の遺伝特性との差異が認められたことから、ヒト健康危害の影響は少ないと想定されたが、ヒトへの危害となり得る VRE が鶏肉から検出された事例が少なからずとも存在するため、今後も市販鶏肉における VRE の危害分析を継続する必要があると考えられる。

平成 29 年度には、食鳥処理場、採卵鶏農場を対象として ESBL を中心に汚染実態を調査し、分離された菌株の性状を明らかにした。寡占が進んだ鶏肉生産では、ブロイラー飼育から鶏肉販売までを一括して行う統合経営体となっているため、ESBL 産生大腸菌もその範囲内で分布することになる。また、鶏肉も各鶏肉生産者の販売ルートによって、地域によって異なる。国内の現状を掌握するには、全国規模の調査が望まれることが示された。

2010 年および 2012 年にヒト由来（健常ボランティア糞便および患者）およびブラジル産鶏肉より分離された $bla_{CTX-M-8}$ 陽性大腸菌の遺伝学的関連性を明らかにするため、全ゲノム解析と $bla_{CTX-M-8}$ プラスミドの全長塩基配列の決定を行った。ヒトおよびブラジル産鶏肉由来の $bla_{CTX-M-8}$ 陽性大腸菌は multilocus sequence typing (MLST) により、それぞれ異なる sequence type (ST) に属していた。一方、それらの大腸菌が保有した $bla_{CTX-M-8}$ 搭載プラスミドは全て IncI1 型であった。それらのプラスミドは全長が酷似していた。また、これらのプラスミドはブラジルの下水由来大腸菌から検出された $bla_{CTX-M-8}$ プラスミドとも酷似していた。以上のことから、本邦のヒトから分離される

*bla*_{CTX-M-8} 陽性大腸菌が保有する *bla*_{CTX-M-8} はブラジルに由来すると考えられた。

A. 研究目的

食中毒菌の薬剤耐性獲得のリスクマネージメントに必要な基礎となるデータの収集を行うことを目的とした。食品としては鶏肉を対象とした。鶏肉に汚染の認められる基質特異性拡張型βラクタマーゼ (ESBL) 産生菌は、第三世代セフェム系抗菌薬を分解する代表的な院内感染症起因菌の一つである。環境、食品及びヒトからの ESBL 産生菌の分離に関する文献情報を調べ、食品を介した人への伝播に関する危害分析を行った。その結果から、鶏の ESBL 産生大腸菌が、鶏肉を通じヒトへの伝播に重要であることが判明した。また、ESBL 産生菌は、菌株自体の直接伝播ではなく、ESBL 産生遺伝子を含むプラスミドがヒト腸内細菌へ伝播することで ESBL 産生菌の拡散に大きく寄与する可能性が示唆されている。

また、鶏肉は ESBL 産生菌だけではなく、バンコマイシン耐性腸球菌 (VRE) の保菌リスクも報告されている。国内の輸入鶏肉より VRE が検出された事例が報告されており、鶏肉を介して直接的にヒトへ伝播・拡散すると示唆されている。さらに、VRE はヒトへ伝播した後、ヒト腸管内に定着する可能性も危惧されている。

国産・輸入市販鶏肉を対象として ESBL 産生大腸菌および VRE の汚染実態を調査すると共に、ESBL 産生大腸菌株が保有する IncI1 プラスミドの分子疫学的傾向について検討を行った。

2010 年、ブラジルを中心に南米から報告されている、基質特異性拡張型β-ラクタマーゼ: ESBL のひとつである CTX-M-8 をコードする *bla*_{CTX-M-8} が陽性の大腸菌が健常ボランティアから分離された。2012 年に市販ブラジル産鶏肉から ESBL 産生大腸菌の分離を試みたところ、分離された ESBL 産生大腸菌は *bla*_{CTX-M-2} と *bla*_{CTX-M-8} 陽性株が約半数ずつを占めていた。本研究では、健常ボランティアと市販ブラジル産鶏肉由来 *bla*_{CTX-M-8} 陽性大腸菌の遺伝学的関連性を明らかにすることを試みた。

B. 研究方法

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 (供試検体数 50 検体) 又は VRE (17 検体) を分離した。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 産生大腸菌の分離には 1µg/mL セフトキシム含有マッコンキー寒天培地及びクロモアガー ESBL を用い、VRE では 1µg/mL バンコマイシン含

有 Enterococcosel 寒天培地 (BD) 及びクロモアガー・VRE スクリーン (関東化学) を用いた。分離された ESBL 産生大腸菌及び VRE 菌株は、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に供した。

ESBL 産生大腸菌株については、プラスミドレプリコン型の同定及び IncI1 の pMLST 型別を行った。これらの方別結果は、Plasmid MLST databases (<https://pubmlst.org/plasmid/>) におけるヒトおよび鶏由来株との比較を行った。

食鳥処理場における検体及び検体採取では、東北地方の 1 食鳥処理場の協力の下、16 食鳥処理日において、各日の最初に食鳥処理された農場の鶏群 (第 1 鶏群) 及び 2 番目に処理された別農場の鶏群 (第 2 鶏群) の各鶏群について、3 羽の盲腸内容物及び鶏肉 (むね) パック 1 個 (2kg 入り) を採取し、採取日に当所に冷蔵宅配便で送付し、翌日、当所において、検体採取後 24 時間以内に分離検査を開始した。また、農場飼養管理及び鶏群に関するアンケートを実施した。なお、ヒナは自社生産ではなく、複数のヒナ生産会社から購入していた。

採卵鶏農場における検体及び検体採取では、関東周辺及び九州周辺で採卵鶏の診療を行っている獣医師の協力の下、30 か所の採卵鶏農場及び 1 か所の育雛・育成農場において、各農場 2 鶏群 (農場内において弱齢な鶏群及び廃用間際な鶏群) から盲腸便 (糞便ベルトから各 5g 以上) を採取した。また、カンピロバクター分離用として、各鶏舎の 3 ケージの 3 羽の総排泄腔スワブを採取した。また、農場飼養管理及び鶏群に関するアンケートを実施した。

ESBL 産生大腸菌の分離及び遺伝子型の同定では、食鳥処理場: 盲腸内容物 (ブロイラー鶏群の各群 3 羽で 1 プール検体) について、採卵鶏農場と同様に分離、同定した。鶏肉については、各パックにつき 6 ムネブロックを取り出し、各 25g をスタマック袋に入れ (計 150g)、150mL の緩衝ペプトン水を加え、1 分間スタマック処理を行い (スタマック検体)、鶏肉スタマック検体 2 mL に 8mL の CTX (1mg/L) 加緩衝ペプトン水とよく混合し、100 µL を CTX (1mg/L) 加マッコンキー寒天培地に塗抹し、37°C で 1 日間培養した。また、残りの混合検体を 37°C で 1 日間増菌培養後、100 µL を CTX (1mg/L) 加マッコンキー寒天培地に塗抹し、37°C で 1 日間培養した。さらに、2 食鳥処理日の計 4 群に由来する鶏肉については、スタマック検体 50mL を 200mL の緩衝ペプトン水と混合し、37°C で 1 日間増菌培養後、100 µL を CTX (1mg/L)

加マッコンキー寒天培地に塗抹し、37°Cで1日間培養した。その後、各検体につき、CTX 耐性大腸菌と疑われる集落最大2集落を釣菌し、薬剤感受性ディスクとPCR法により、ESBL産生大腸菌と同定するとともに耐性遺伝子型を同定した。採卵鶏農場：盲腸便1g（採卵鶏農場の各群1検体）をCTX（1mg/L）加緩衝ペプトン水とよく混合し、100 μ LをCTX（1mg/L）加マッコンキー寒天培地に塗抹し、37°Cで1日培養した。また、残りの混合検体を37°Cで1日間増菌培養後、100 μ LをCTX（1mg/L）加マッコンキー寒天培地に塗抹し、37°Cで1日間培養した。その後、食鳥処理場と同様に分離、同定した。

カンピロバクターの分離及び薬剤耐性パターンの同定では、採卵鶏農場：総排泄腔スワブ（採卵鶏農場の各群3羽から3検体）をmCCDAに塗抹し、42°Cで2日間微好気培養した（直接培養）。また、塗抹に使用したスワブの先端を9mLのプレストン増菌液体培地に入れ、42°Cで1日間微好気培養後、1白金耳をmCCDAに塗抹し、42°Cで2日間微好気培養した（増菌培養）。その後、各検体につき、カンピロバクターと疑われる集落最大2集落を釣菌し、PCR法により菌種を同定するとともに、微量液体希釈法（栄研プレート）により、7薬剤（ストレプトマイシン（SM）、エリスロマイシン（EM）、ゲンタマイシン（GM）、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（CPF）及びクロムフェニコール（CP））のMICを測定した。薬剤耐性感受性試験は、各鶏群につき、1菌種1株について実施した。

サルモネラの分離及び薬剤耐性パターンの同定では、食鳥処理場：盲腸内容物（ブロイラーの各群3羽から3検体）の各1gを9mLの緩衝ペプトン水に添加し、37°Cで1日培養後、1mL及び0.1mLをそれぞれ、ハーナ・テトラチオネート培地及びRV培地に添加し、42°Cで1日間培養後、各培地の1白金耳をXLD培地及びクロモアガー・サルモネラ培地に塗抹し、37°Cで1日培養した。また、培養後のハーナ・テトラチオネート培地を室温で5~7日間放置し、1mL及び0.1mLをそれぞれ、ハーナ・テトラチオネート培地及びRV培地に添加し、42°Cで1日間培養後、各培地の1白金耳をXLD培地及びクロモアガー・サルモネラ培地に塗抹し、37°Cで1日間培養した（遅延二次培養）。鶏肉については、スタック検体50mLを緩衝ペプトンに添加し、盲腸内容物と同様に培養した。培養後、各検体につき、サルモネラと疑われる集落最大2集落を釣菌し、抗血清を用いて0群を同定するとともに、微量液体希釈法（栄研プレート）により、12薬剤（アンピシリン（ABPC）、セファゾリン（CEZ）、セフォタキシム（CTX）、GM、カナマイシン（KM）、SM、TC、NA、CPF、コリス

チン（CL）、CP及びトリメトプリム（TMP）のMICを測定した。なお、薬剤感受性試験は、各鶏群の盲腸内容物検体及び鶏肉につき、1菌種1株について実施した。採卵鶏農場：盲腸便5g（採卵鶏農場の各群1検体）を45mLの緩衝ペプトン水に添加し、食長処理場と同様に分離・性状解析を実施した。

コリスチン耐性大腸菌の分離及び耐性遺伝子の同定では、食鳥処理場及び採卵鶏農場：サルモネラ検査用に緩衝ペプトン水に添加・混合された直後のもの（直接培養）、培養後のもの（増菌培養）を各100 μ L、クロモアガー・COL-APSEに塗抹し、37°Cで1日培養した。37°Cで1日間培養した。各検体につき、コリスチン耐性大腸菌と疑われる集落最大2集落を釣菌し、PCR法（*mcr-1*、2又は3）により、耐性遺伝子を同定した。

2010年から2013年にかけて分離されたヒト由来 *bla*_{CTX-M-8} 陽性大腸菌6株（健康ボランティア：5株、患者1株）、ブラジル産鶏肉由来 *bla*_{CTX-M-8} 陽性大腸菌4株の合計10株を供試した。DNAはドラフト全ゲノム解析には次世代シーケンサーのMiSeq（Illumina）を用いた。MiSeqで解読するDNAライブラリの調整にはNextera XT DNA Sample Preparation Kit v2（Illumina）を用いた。MiSeq reagent kit v3, 600 cycles（Illumina）を用いて300bp \times 2のペアエンドリードでDNAライブラリの解読を行った。*de novo* assemblyにはCLC genomics workbench（QIAGEN）を用いた。

MiSeqの短解読塩基長では *bla*_{CTX-M-8} 搭載プラスミドの全長を明らかにすることができなかったため、それらの解読には長解読塩基長のPacBio RS（Pacific Biosciences）を用いた。PacBio RSで解読するDNAライブラリの調整には、DNA Template Prep kit, version 1.0を用いた（Pacific Biosciences）。DNA/Polymerase Binding Kit P5、MagBeads、および1つのSMRT（single-molecule, real-time）cellを用いて180分間の動画を撮影した。PacBio RSデータの *de novo* assemblyにはa hierarchical genome assembly process（HGAP, version 3.0）を用いた。薬剤感受性遺伝子の網羅的検索にはResFinder 3.0を用いた。（<https://cge.cbs.dtu.dk/services/ResFinder/>）MLST解析はMLST 1.8（<https://cge.cbs.dtu.dk//services/MLST/>）を用いて行った。プラスミドの不和合性（Inc/rep type）型別にはPlasmidFinder 1.3（<https://cge.cbs.dtu.dk//services/PlasmidFinder/>）を用いた。プラスミド塩基配列のアノテーションにはDDBJ Fast Annotation and Submission Toolを用いた。（DFAST, <https://dfast.nig.ac.jp/>）

プラスミド塩基配列の比較と図示にはEasyFig

(<http://mjsull.github.io/Easyfig/>) を用いた。比較対象とした塩基配列は公共データベース GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) よりダウンロードした。

(倫理面への配慮)

病原体の取扱いについては、国立医薬品食品衛生研究所病原体等安全管理規程に従い、適切な管理を行った。

C. 研究結果

市販鶏肉の ESBL 産生大腸菌の陽性率は全体で 76.0%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 (有意差なし [P>0.05])。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。保有する耐性遺伝子の傾向を、国内鶏肉と輸入鶏肉で比較したところ、有意な差は認められなかった (P>0.05)。耐性遺伝子を保有する菌株を対象として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。さらに、分離菌株を PFGE 型別した結果、全体的に類似性は乏しく、各分離菌株は異なるものであることが示された。プラスミドレプリコン型は、IncF が 64.4%、IncFIB が 55.5%、IncI1 が 31.1%認められた。blaCTX-M-1 及び blaCTX-M-15 を併せ持つ分離菌株では、IncI1 が 73.3%の割合で認められた。分離菌株が保有する IncI1 のプラスミドサイズはほぼ同等であり、100kb 前後であった。

調査した市販鶏肉の VRE はの陽性率は全体で 63.6%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 (有意差なし [P>0.05])。しかし、分離された 22 株のほとんどが *E. gallinarum* であり、vanC1 遺伝子を保有していた。*E. faecium* 及び *E. faecalis* は同定されず、vanA 及び vanB の両遺伝子も検出されなかった。分離菌株のバンコマイシンに対する MIC は、2~8µg/mL と低い傾向であった。また、バンコマイシン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 95.5%と最も多く、続いてカナマイシン耐性 (81.8%)、ストレプトマイシン耐性 (54.5%) 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、4.5%に耐性が認められたが、ほとんどが感受性であった。これらの菌株の諸性状と PFGE 型より、各分離株は異なるものであることが示された。

食鳥処理場では、全 16 食鳥処理日で処理した鶏群は、15 農場 (A~O) に由来する 32 鶏群であった。調査対象鶏群の出荷日齢は 45~55 日間であった。アンケート結果によると、A 農場は、今回の調査の中で最も生産規模が大きく、29 鶏舎で構成されており、年 6 回、1 回あたり約 35 万羽を飼育している。一方、E 農場は、最も生産規模が小さく、3 鶏舎で年 5 回、1 回あたり約 1 万 6 千 5 百羽の鶏を飼育している。なお、A 農場は鶏舎数が多いため、農場単位のオールインオールアウトが行われていないが、他の 14 農場では行われている。今回の調査では、A 農場から 14 鶏群が調査対象となり、その他の 4 農場 (C、G、I 及び N) は 2 鶏群が調査対象となった。調査対象となった 32 鶏群には、食鳥処理場への出荷まで抗菌剤は使用されておらず、9 鶏群 (28%) に対しては抗菌性飼料添加物も与えられていなかった。添加された抗菌性飼料添加物は、サリノマイシン、エンラマイシン、アピラマイシン、硫酸コリスチンであり、硫酸コリスチンは 10 鶏群 (31%) に与えられていた。

ESBL 産生大腸菌：鶏肉については、1 検体 (3%) から CTX 耐性大腸菌が分離され、CTX-M-2 を保有する ESBL 産生大腸菌であった。しかし、この鶏肉の由来となった鶏群及びその前に食鳥処理された鶏群の盲腸内容物からは分離されなかった。盲腸内容物については、11 群 (34%) から CTX 耐性大腸菌が分離され、4 鶏群 (13%) に由来する株が ESBL 産生大腸菌 (CTX-M2) であり、2 農場 (A 及び N) から出荷された鶏群であった。CTX-M-2 が分離された A 農場の鶏群は同一ヒナ生産者から購入したものであったが、N 農場は、A 農場とは別の 2 つのヒナ生産者から購入したものであった。第 15 回と第 16 回は、鶏肉の検体量を 25g (増菌培養について) に増量したが、盲腸内容物から ESBL 産生大腸菌が分離された 2 鶏群を含め、鶏肉から ESBL 産生大腸菌は分離されなかった。

サルモネラ：鶏肉については、21 検体 (66%) から分離され、20 検体では、その鶏肉の由来となった鶏群の盲腸内容物から同じ血清型で同じ薬剤耐性パターンの株が分離された。残りの 1 検体は、由来となった鶏群の盲腸内容物からサルモネラが分離されなかったが、その鶏群の前に食鳥処理された鶏群の盲腸内容物から同じ血清型で同じ薬剤耐性パターンの株が分離された (交叉汚

染)。最もよく分離された株は、5 剤 (ABPC、CEZ、SM、TC 及び TMP) に耐性な 07 群で 8 検体から分離された。この 8 検体のうち 7 検体は、A 農場の鶏群に由来する鶏肉であり、残りの 1 検体は、上述の交叉汚染検体であった。次によく分離されたのは、KM 耐性の 04 群で、7 検体から分離され、すべて異なる農場の鶏群由来であった。盲腸内容物については、27 鶏群 (84%) から分離された。8 鶏群では、3 羽中 3 羽の盲腸内物からサルモネラが分離され、それらの鶏肉から同一株と考えられる株が分離された。

コリスチン耐性大腸菌：鶏肉については、2 検体から分離され、うち 1 検体はその由来となった鶏群の盲腸内容物からも分離された。盲腸内容物では、鶏肉から分離された鶏群以外にも 3 鶏群から分離された。

採卵鶏農場では、ESBL 産生大腸菌：30 採卵鶏農場の計 60 鶏群のうち、CTX 耐性大腸菌は 15 農場 (50%) の 18 鶏群から分離され、ESBL 産生大腸菌と同定された株は、9 農場 (30%) の 12 鶏群から分離された。ESBL 産生大腸菌陽性 9 農場のうち、2 鶏群ともに陽性だったのは 3 農場で、残りの 6 農場のうち 5 農場では、陽性であった鶏群はすべて若齢鶏群であった。耐性遺伝子型は 3 型に分類され、CTX-M-1 型が最も多く (7 農場の 8 鶏群)、次いで CTX-M-9 (2 農場 2 鶏群)、CTX-M-2 (2 農場 2 群) であった。地域別にみると、関東周辺の農場分離率 (21%:5/24) は九州周辺の農場分離率 (67%:4/6) と比べ有意に低かった。CTX-M-1 型の分離状況に地域的な偏向はなかった。なお、8 農場の 8 鶏群から分離された CTX 耐性大腸菌は AmpC を有していた。育雛・育成農場については、2 鶏群とも ESBL 産生大腸菌が分離され、耐性遺伝子型は CTX-M-1 と CTX-M-9 であった。

カンピロバクター：30 採卵鶏農場の全農場 (100%) の 52 鶏群から分離された。*C. jejuni* は、28 農場 (93%) の 49 鶏群から分離された。薬剤耐性について農場単位でみると、TC の 33% (10/30) が最も高く、次いで CPFX (NA を含む) の 28% (8/30) であった。ただし、農場の 2 鶏群とも CPFX 耐性株であった農場はなく、CPFX 耐性については、8 農場のうち 7 農場において耐性株が分離されたのは若齢鶏群であり、有意に若齢鶏群の CPFX 耐性株の分離率が高かった (ピアソンのカイ二乗検定 $P = 0.023$)。さらに、地域別にみると、関東周辺の CPFX 耐性菌農場分離率 (21%:5/24) は九州周辺の農場分離率 (50%:3/6) と比べ高い傾向が見られた。その他の 4 薬剤 (SM、EM、GM 及び CP) に対する耐性はなかった。*C. coli* は、13 農場 (43%) の 18 鶏群から分離された。薬剤耐性については、TC 耐性株が 2 農場 (7%) から分離されたのみで、他の 6 薬剤に対する耐性

はなかった。*C. coli* 陽性 13 農場のうち 12 農場は関東周辺に所在した。

サルモネラ：2 農場の 2 鶏群から分離され、どちらも 08 群であった。薬剤耐性については、1 農場の分離株は TMP に耐性であった。

コリスチン耐性大腸菌：1 農場の 2 鶏群から分離され、*mcr-1* を有していた。なお、図表等の詳細なデータについては、各年度の総括研究報告書に示した。

市販ブラジル産鶏肉由来およびヒト由来 *bla*_{CTX-M-8} 陽性大腸菌の Multilocus sequence typing (MLST) の結果において、共通する sequence type (ST) あるいは clonal complex (CC) に属する大腸菌はなかった。一方、由来が異なる大腸菌が保有した *bla*_{CTX-M-8} 搭載プラスミドの完全長塩基配列を決定したところ、全て IncI1 型であった。それらのプラスミドの比較解析の結果、全長が酷似していた (図 1)。また、これらのプラスミドはブラジルの下水由来大腸菌から検出された *bla*_{CTX-M-8} 搭載プラスミドとも酷似していた (図 1)。

由来	管理番号	年	ST	CC
ブラジル産鶏肉	TUM12355	2012	7285	-
	TUM 12357	2012	10	10
	TUM 12358	2012	10	10
	TUM 12368	2012	648	648
健常人	TUM 10828	2010	69	69
	TUM 11352	2011	131	131
	TUM 11353	2011	2278	131
	TUM 13936	2013	4387	-
	TUM 13937	2013	4387	-
臨床分離株	TUM 13754	2012	127	127

表 1. 大腸菌の由来、分離年度、sequence type (ST)、および clonal complex (CC)

D. 考察

国内の市販鶏肉から ESBL 産生大腸菌が 76.0% と高率で分離され、他の報告と比べても高い陽性率であった。また、分離菌株の多くが、ヒト由来 ESBL 産生大腸菌で比較的多く認められる CTX-M-1 型と CTX-M-2 型であり、さらに、近年の流行型として危惧されている CTX-M-15 型の存在も認められた。これは、市販鶏肉が ESBL 産生大腸菌に汚染されている実態を示す成績であると共に、ヒトへの ESBL 産生大腸菌の伝播には鶏肉が重要である可能性が考えられ、鶏肉からヒトへの伝播リスクが示唆された。

CTX-M-1 及び CTX-M-15 産生大腸菌は、プラスミドレプリコン型として Inc I1 を保有する傾向が認められた。IncI1 は ESBL 産生遺伝子との関連が強く示唆されており、本邦においても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。IncI1 プラスミドの MLST 型を決定

し、ヒト由来及び鶏由来 IncI1 プラスミドと比較解析を行うことで、ESBL 産生菌の拡散機構を明らかにした。

市販鶏肉中の VRE として 63.6%の陽性率が認められたが、いずれも *E. gallinarum* であると共に vanC1 遺伝子を保有していた。臨床上で重要視されている VRE は、vanA 又は vanB 遺伝子を保有する *E. faecium* 及び *E. faecalis* であり、本邦では検出されなかった。しかし、今回用いた供試検体数が少ないことから、今後さらに多くの検体を対象として市販鶏肉における VRE の危害分析を行う必要があると考えられる。

食鳥処理場の調査では、鶏肉の ESBL 産生大腸菌については、1 検体のみから CTX-M-2 型の耐性遺伝子を有する株が分離され、この分離率は過去の調査結果と比べ、かなり低いものであった。その理由としては、まず、調査を実施した食鳥処理場に搬入された調査対象 32 鶏群のうち、ESBL 産生大腸菌が分離されたのは 4 鶏群 (13%) と既報の農場陽性率よりもかなり低かったことが挙げられる。サルモネラの結果をみると、27 鶏群 (84%) から分離され、鶏肉でも 21 検体 (66%) から分離されたものの、CTX 耐性株はなかった。さらに、近年の抗菌性物質使用や耐性菌に対する消費者の関心の高まりに対応するため、無薬鶏の飼育数が増加しており、今回の調査でも 7 鶏群 (25%) に対し、抗菌性飼料添加物は使用されていなかった。

加えて、コリスチン耐性大腸菌の結果をみると、4 鶏群の盲腸内容物から分離されているが、鶏肉は 2 検体のみ陽性であり、サルモネラの結果でも、27 鶏群の盲腸内容物から分離されているが、鶏肉は 20 検体が陽性と、ESBL 産生大腸菌、コリスチン耐性大腸菌或いはサルモネラに感染した鶏群に由来する鶏肉のすべてがそれに汚染されるわけではないことを示している。また、今回の調査では食鳥処理場で検体を採取後、冷蔵宅配便にて迅速に当所に発送し、検体採取後 24 時間以内に分離検査を開始しており、店頭販売品と比べ、温度条件、検査開始までの時間など、検体中で ESBL 産生大腸菌が増殖できる環境でありなかつたとも考えられる。耐性遺伝子については、今回調査した鶏群は、CTX-M-2 を保有する ESBL 産生大腸菌しか分離されなかった。この結果は、国内の ESBL 産生大腸菌は、食鳥処理場を中心とする鶏肉生産者によって、ESBL 産生大腸菌株の耐性遺伝子型が異なる可能性を示しており、国内の状況を把握するためには、鶏肉生産量や地域を考慮したモニタリングの必要であることを示している。また、農場の生産規模も大小様々であり、これも考慮しなければならないと考えられる。

採卵鶏農場調査については、5 割の農場から

ESBL 産生大腸菌が分離され、肉用鶏農場よりも抗菌剤使用機会が低いと考えられる採卵鶏農場も ESBL 産生大腸菌に高率に汚染されていることが判明した。しかし、若齢鶏群と比べ、廃用期に近い鶏群 (老齢鶏群) からは分離されない傾向がみられた。耐性菌と鶏の日齢の関係について、カンピロバクターの結果をみると、有意に老齢鶏群の方が、若齢鶏群より CPFY 耐性株分離率が低かった。さらに、育雛・育成農場では 2 鶏群とも ESBL 産生大腸菌が分離された。以上のことから、育雛・育成農場での抗菌剤使用により、耐性菌が選択され、感染育成鶏が採卵鶏農場に運ばれる。しかし、産卵鶏農場に育成鶏とともに運ばれると、選択圧の少ない採卵鶏農場環境下で徐々に汚染濃度が低下していくと考えられた。分離された ESBL 産生大腸菌の耐性遺伝子は、地域に関係なく CTX-M-1 が多く、既報及び今回の肉用鶏農場の汚染状況とは異なっていた。

今回の食鳥処理場及び肉用鶏農場の調査結果は、国内の養鶏産業の状況をよく反映していた。鶏肉生産は寡占が進み、大手の鶏肉生産者は、ブロイラー飼育から鶏肉販売までを一括して行う統合経営体となっているため、ESBL 産生大腸菌もその範囲内で分布することになる。また、鶏肉も各鶏肉生産者の販売ルートによって、地域によって異なる。つまり、フードチェーンの各段階でモニタリングを実施しても、全国規模の調査を除き、サンプリングした検体の素性が明らかでなければ、その結果を他の段階の結果と定量的に比較することはできないと考えられた。

ブラジル産鶏肉およびヒト由来 *bla*_{CTX-M-8} 陽性大腸菌は異なる ST に属していたことから、ブラジル産鶏肉を汚染する *bla*_{CTX-M-8} 陽性大腸菌が直接ヒト腸管へ定着したとは考えられなかった。一方、いずれの由来の大腸菌が保有した *bla*_{CTX-M-8} 搭載プラスミドは酷似していたことから、ブラジル産鶏肉由来大腸菌が保有した *bla*_{CTX-M-8} 搭載プラスミドがヒト腸管内に定着する大腸菌へ伝達された可能性が示唆された。また、それらのプラスミドはブラジルの下水から分離された大腸菌が保有した *bla*_{CTX-M-8} 搭載プラスミドとも全長構造が酷似していたことから、本邦のヒトより分離された *bla*_{CTX-M-8} 陽性大腸菌が保有した *bla*_{CTX-M-8} はブラジルに由来することが強く示唆された。

E. 結論

国内の市販鶏肉の調査からは、国内・国外産市販鶏肉が ESBL 産生大腸菌に汚染されていると共に、ヒトへの ESBL 産生大腸菌の伝播には鶏肉が最も重要である可能性が示唆された。また、接合伝達性プラスミドによる鶏肉からヒトへの伝播

リスクも推測された。一方で、臨床上で重要視されるVREによる汚染は少ないと考えられたが、今後さらなる危害分析を行う必要があると考えられた。

食鳥処理場及び肉用鶏農場の調査結果寡占が進んだ鶏肉生産では、ブロイラー飼育から鶏肉販売までを一括して行う統合経営体となっているため、ESBL産生大腸菌もその範囲内で分布することになる。また、鶏肉も各鶏肉生産者の販売ルートによって、地域によって異なる。国内の現状を掌握するには、全国規模の調査が望まれる。

ヒト分離株の検討では、本邦のヒトから分離される *bla*_{CTX-M-8} 陽性大腸菌が保有する *bla*_{CTX-M-8} はブラジルに由来すると考えられた。

F. 健康危険情報

(分担研究報告書には記入せずに、総括研究報告書にまとめて記入)

G. 研究発表

1. 論文発表

1) 山本詩織、朝倉 宏、五十君静信。基質特異性拡張型βラクタマーゼ (ESBL) 産生菌に関わる最近の動向とその拡散に関する考察 ～食品汚染実態とその危害性について～食品衛生学会誌 58巻1号1-11. (2017)

2. 学会発表

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) 山本詩織、吉田麻利江、岡田由美子、朝倉 宏、

五十君静信：市販鶏肉におけるESBL産生大腸菌及びVREの汚染実態と分離株の遺伝特性について、日本防菌防黴学会第43回年次大会、2016年9月、東京

3) 山本詩織、朝倉 宏、岡田由美子、吉田麻利江、五十君静信：国内の市販鶏肉由来ESBL産生大腸菌が保有するIncI1プラスミドの分子疫学的傾向とその特性について、第90回日本細菌学会総会、2017年3月、宮城

4) 朝倉宏、山崎栄樹、小西良子、五十君静信、山本茂貴：細菌学領域における基礎と臨床のクロストークセッション-カンピロバクター・ジェジュニが顕す生存・生息のための環境応答。第90回日本細菌学会学術総会。2017年3月。宮城

5) Yoshikazu Ishii, Kotaro Aoki Ayaka Kusano, Yukihiro Akeda, Shoua Nakamura, Daisuke Motooka, Kazuhori Tomono, Tsuyoshi Sekizuka, Tetsuya Iida, Makoto Kuroda, Kazuhiro Tateda. 2017. June 16. Spreading of the *bla*_{CTX-M-8} carrying plasmid in human was mediated by its possessed *Escherichia coli* contaminated chicken meat; a public health concern. 13th beta-lactamase meeting, Santo Stefano di Sessanio, L' Aquila, Italy.

6) 山本 詩織、朝倉 宏、石井 良和、五十君 静信。国内の市販鶏肉から分離されたバンコマイシン耐性 *Enterococcus gallinarum* のフルオロキノロン耐性について。第91回日本細菌学会総会、2018年3月 (福岡)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
2. 実用新案登録
3. その他

図1. 由来が異なる大腸菌が保有した blaCTX-M-8 搭載プラスミドの完全長塩基配列比較

